

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY
ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

JUN 24 '64

ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ERFORSCHUNG
DER PFLANZLICHEN MIKROORGANISMEN

BEGRÜNDET VON
J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPET

HERAUSGEGEBEN VON

R. HARDER C. B. VAN NIEL R. NILSSON E. G. PRINGSHEIM
GÖTTINGEN PACIFIC GROVE UPPSALA CAMBRIDGE
A. RIPPET-BALDES W. H. SCHOPFER H. TAMIYA
GÖTTINGEN BERN TOKIO

SCHRIFTLEITUNG

A. RIPPET-BALDES R. HARDER
GÖTTINGEN GÖTTINGEN

17. BAND · 1. HEFT

MIT 15 TEXTABBILDUNGEN
(ABGESCHLOSSEN AM 10. MÄRZ 1952)



Per BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
QR 1 SPRINGER-VERLAG
Ar 25 1952

Das

Archiv für Mikrobiologie

steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden.

Das „Archiv“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials. Der Preis des Bandes beträgt DM 96.—.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16 seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 30.— für eine Arbeit. Sammelreferate werden mit DM 40.— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht, und zwar bis zum 31. Dezember desjenigen Kalenderjahres, das auf das Jahr des Erscheinens folgt. Hieraus ergibt sich, daß grundsätzlich nur Arbeiten angenommen werden können, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Schriftleitung:

Prof. Dr. A. Rippel-Balde, Göttingen, Institut für Mikrobiologie, Goßlerstr. 16,
Prof. Dr. R. Harder, Göttingen, Pflanzenphysiolog. Institut, Nikolausberger Weg 18.

Springer - Verlag

Berlin · Göttingen · Heidelberg

Vertriebsvertretung im Ausland:

Lange, Maxwell & Springer Ltd., 41-45 Neal Street, London W. C. 2

17. Band

Inhaltsverzeichnis.

1. Heft

Seite

STOLP, H., Beiträge zur Frage der Beziehungen zwischen Mikroorganismen und höheren Pflanzen. Mit 11 Textabbildungen	1
STOLP, H., und E. SPEYER, Zur Frage der Anpassungsfähigkeit von Azotobacter. Kritische Bemerkungen zu den von N. MALTSCHEWSKY mitgeteilten Ergebnissen	30
ALLEN, M. B., The Cultivation of Myxophyceae.	34
WICHTMANN, H., Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Azotobactergehalt und Bodenfruchtbarkeit	54
BUKATSCH, Fr., und J. HEITZER, Beiträge zur Kenntnis der Physiologie von Azotobacter. I. Mitteilung. Mit 4 Textabbildungen	79

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen).

Beiträge zur Frage der Beziehungen zwischen Mikroorganismen und höheren Pflanzen*.

Von
HEINZ STOLP.

Mit 11 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. August 1951.)

Das Zusammenleben zwischen Mikroorganismen und höheren Pflanzen ist, soweit es sich um ein solches mit äußerlich erkennbaren Symptomen handelt, meist weitgehend geklärt. Über die gegenseitige Beeinflussung der allgemeinen Bodenmikroflora und höheren Pflanzenwelt besteht jedoch weniger Klarheit. Es ist dies eine Folge der methodischen Schwierigkeiten, die für alle Untersuchungen im natürlichen Boden wegen der nicht zu überschreitenden Vielzahl mitwirkender Faktoren zutreffen. Besonderes Interesse fanden die mikrobiologischen Verhältnisse im Wurzelbereich, weil hier Bodenmikroflora und Pflanzenwurzeln — beide an ihrem natürlichen Standort — unmittelbar zusammenleben. Von HILTNER ist für die wurzelnähe Zone, die sich durch eine allgemeine Anreicherung der Mikroorganismen auszeichnet, der Begriff der „Rhizosphäre“ eingeführt worden. Um, im Vergleich zum wurzelfreien Boden, die Verhältnisse im engeren Wurzelbereich in Abhängigkeit von jahreszeitlichen Einflüssen, von Entwicklungsstadium und Wachstumsbedingungen der Pflanze sowie anderen Faktoren zu klären, wurden bisher fast ausschließlich indirekte Untersuchungsmethoden angewendet: z. B. Keimzahlbestimmungen nach dem Kochschen Plattenverfahren, Ermittlung der Stoffwechselintensität bestimmter physiologischer Gruppen und die Auswertung von Cholodny-Bodenplatten.

In den eigenen Untersuchungen sollte durch eine direkte Beobachtung bestimmter Mikroorganismen im Wurzelbereich zur Klärung der Verhältnisse beigetragen werden. Es wurden 1. die Beziehungen zwischen Mikroorganismen und *in vitro* kultivierten, isoliert wachsenden Pflanzenwurzeln geprüft; 2. wurde das Verhalten der Organismen im Wurzelbereich steril kultivierter Pflanzen untersucht. Die Durchführung dieser Versuche erforderte eine Auseinandersetzung mit der Frage der Sterilisation von Samen und Früchten und der inneren Sterilität von Samen (wie auch von Pflanzengeweben im allgemeinen). Die Ergebnisse sind den in 1. u. 2. mitgeteilten Untersuchungen vorangestellt. Weiter wurde 3. das Problem der organischen Wurzelausscheidungen behandelt und 4. die Frage der antagonistischen Beeinflussung von Knöllchenbakterien im Wurzelbereich von Leguminosen untersucht.

Zur Sterilisation von Samen und Früchten.

Für die Kultur abgeschnittener, isoliert wachsender Wurzeln ist ein äußerlich steriler und keimfähiger Same unbedingte Voraussetzung. Dasselbe gilt für die sterile Aufzucht von Pflanzen, wenn man z. B. — wie in der vorliegenden Arbeit —

* Ausführlichere Darstellung in der gleichnamigen Dissertation, Göttingen 1951.

das Verhalten bestimmter Bakterien im Wurzelbereich untersuchen will. Auch die Frage der aktiven Wurzelausscheidungen erfordert steriles Arbeiten; anderenfalls wäre es nicht zu vermeiden, daß die Ergebnisse durch die unkontrollierbare Tätigkeit von Mikroorganismen irgendwie beeinflußt werden. Nichtbeachtung dieser Forderung hat vielfach zu Fehlschlüssen geführt. So wird von PAECH berichtet, daß nach SCHWABE die Beeinflussung der Pflanzenatmung durch Aminosäuren eine deutliche Förderung erkennen ließ, die in Wirklichkeit jedoch auf eine durch die Zufuhr der Aminosäuren stark begünstigte Bakterienentwicklung zurückzuführen war.

Für die Sterilisation von Pflanzensamen und Früchten sind zahlreiche Methoden angegeben worden. KLEIN u. KISSEK z. B. zitieren 114 Arbeiten, die sich in irgend-einem Zusammenhang mit dem Problem der Samensterilisation oder der sterilen Aufzucht von Pflanzen befassen. Im Zuge der Entwicklung pflanzlicher Organ- und Gewebekulturen sind die Methoden verbessert und ausgebaut worden. Dennoch existiert keine Standardmethode, und fast alle Experimentatoren haben mit eigenen Verfahren gearbeitet.

Daß die Sterilisation von Samen auch heute noch Schwierigkeiten macht, geht aus einer Arbeit von ASH und ALLEN hervor, die 1948 11 verschiedene zur Samensterilisation empfohlene Methoden vergleichend überprüft und dabei keines der angegebenen Verfahren für absolut zuverlässig befunden haben. Die Infektionsrate schwankte zwischen 2 und 15%; eine 100%ige Desinfektionswirkung war nur auf Kosten verminderter Keimfähigkeit zu erreichen.

Die Ergebnisse der verschiedenen Methoden sind vielfach widersprechend. Das kann seine Ursache in geringen Variationen der Methodik, in der verschiedenen Widerstandsfähigkeit der Samen, ihrem Alter und der Art der Aufbewahrung oder auch in der Vorbehandlung des jeweils verwendeten Materials haben. Übereinstimmend wurde jedoch festgestellt, daß zur Erreichung der Außensterilität von Samen und Früchten längere Einwirkungszeiten erforderlich sind als zur Abtötung von Bakterien und Sporen, wenn diese allein behandelt werden. Das hat seinen Grund in der Textur der Samenschale sowie der Struktur des Samens, die eine Benetzung erschweren und durch Bildung von Luftsäcken die darin befindlichen Bakterien der Einwirkung des Desinfektionsmittels entziehen. Damit wird verständlich, daß nicht nur die Art des Desinfektionsmittels, seine Konzentration sowie die Einwirkungsdauer entscheidend sind, sondern in erster Linie die völlige Benetzung des Samenmaterials.

Mit dem nachstehend beschriebenen Verfahren konnte absolute Oberflächensterilität ohne Beeinträchtigung der Keimfähigkeit erreicht werden. Es wurde eine einfache Anlage konstruiert, die im Gegensatz zu einer Anzahl komplizierter, z. B. bei KLEIN u. KISSEK beschriebener Apparaturen eine Sterilisation im Unterdruck und nach anschließend mehrfachem Spülen der Samen mit sterilem Wasser — zur restlosen Entfernung des Desinfektionsmittels — eine sterile Durchlüftung während der Quellung ermöglichte.

Das Samenmaterial wurde zunächst in folgender Weise vorbehandelt:

1. Unverletzte Samen wurden in einer Seifenlösung 5 min lang kräftig geschüttelt. (Bei Maiskörnern wurde vorher der Fruchtwinkel mit einem Skalpell entfernt, da sich dieser häufig als durch Pilze infiziert erwies. Dieselbe Beobachtung haben auch FIEDLER u. a. gemacht.)

2. Kräftiges Spülen in fließendem Wasser, 30 min.

3. Ätherbad, 45 sec.

4. Erneutes Spülen in fließendem Wasser, 15 min.

5. Vorsterilisation in 0,1% Sublimat-Saponin-Lösung, 5 min im Vakuum. (Das Sublimat-Saponin-Gemisch wird wegen der oberflächenaktiven Wirkung von RUGE als Sterilisationsmittel empfohlen. Mit dieser Lösung allein konnte eine absolute Außensterilität jedoch nicht erreicht werden.)

6. Nachspülen mit Aqua dest. bis zur völligen Beseitigung des durch das Saponin bewirkten Schäumens.

Danach erfolgte die eigentliche Sterilisation mit 0,75% Bromwasser. (Einwirkungszeit für Mais 5, für Erbsen 6 min.)

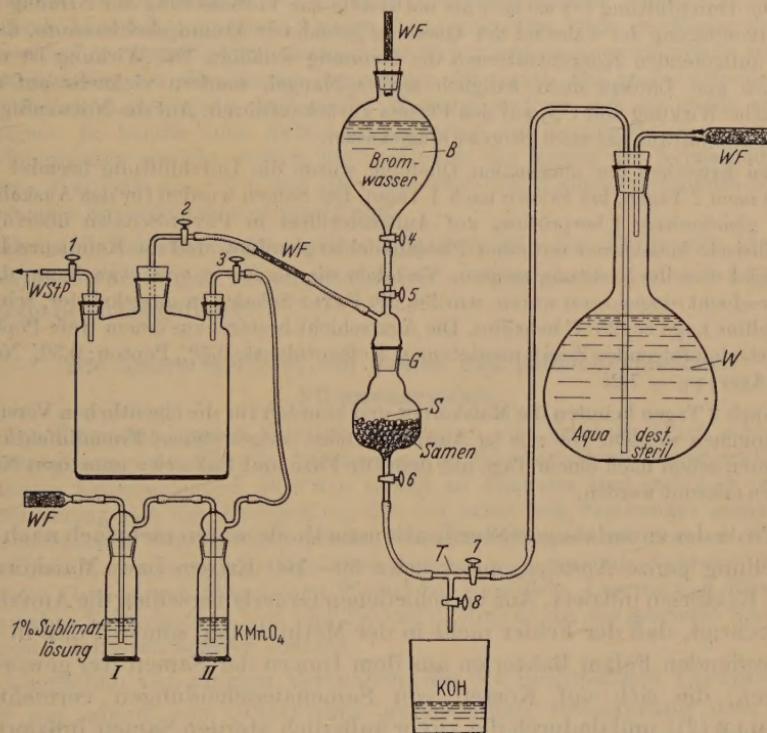


Abb. 1. Sterilisationsapparatur (Erklärung der Zeichen im Text).

Die Sterilisationsapparatur ist in Abb. 1 dargestellt; der Arbeitsgang ist folgender: Die vorbehandelten Samen werden in das Sterilisationsgefäß *S* überführt, der Glaschliff *G* mit Alkohol abgedichtet. Die für sich im Autoklaven sterilisierte Wasserflasche *W* wird kurz vor dem Gebrauch an das T-Stück *T* angeschlossen. Nach der Verbindung des Sterilisationsgefäßes *S* mit dem T-Stück, dem Scheidetrichter *B*, der die Bromlösung enthält, und der Woulfschen Flasche werden alle Glashähne bis auf Nr. 8 geöffnet. Das Bromwasser füllt dann in etwa 40 sec die Apparatur *S* und die nichtsterilisierten Teile des Verbindungsstückes zur Wasserflasche. Nach Aufsteigen des Bromwassers im Verbindungsrohr bis zu halber Höhe wird der Hahn 7 geschlossen. Ist *S* bis etwa 2 cm unter den Absaugestutzen mit der Bromlösung angefüllt, werden die Hähne 5 und 3 geschlossen und mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe ein Vakuum angelegt. Nach Beendigung der Sterilisationszeit wird 1 geschlossen

und 3 langsam geöffnet. Darauf wird auch 8 geöffnet und das abfließende Bromwasser in Natronlauge eingeleitet. Durch Bedienung der entsprechenden Glashähne und der Wasserstrahlpumpe wird darauf steriles Wasser in die Apparatur herübergezogen und anschließend — wie das Bromwasser — in die Lauge abgeleitet. Das Spülen mit sterilem Wasser wird 5—10 mal durchgeführt. Bei anschließender Durchlüftung der in dem sterilen Wasser quellenden Samen werden die Waschflaschen I und II vor das Wattefilter der Wasserflasche W geschaltet und mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe ein schwacher Luftstrom durch das Sterilisationsgefäß geschickt.

Die Durchlüftung erwies sich als notwendig zur Verbesserung der Atmung und zur Beseitigung der während der Quellung gebildeten Atmungskohlensäure, die in den auftretenden Konzentrationen die Keimung schädigt. Die Wirkung ist nach CHANG und LOOMIS nicht lediglich auf O₂-Mangel, sondern vielmehr auf eine toxische Wirkung von CO₂ auf das Plasma zurückzuführen. Auf die Notwendigkeit der Durchlüftung hat auch BURLET hingewiesen.

Bei Erreichen der maximalen Quellung wurde die Durchlüftung beendet (bei Mais nach 2 Tagen, bei Erbsen nach 1 Tage). Die Samen wurden für das Auskeimen und gleichzeitige Überprüfung auf Außensterilität in PETRI-Schalen überführt; sterilisierte Maiskörner mit einer Platinadel so geordnet, daß die Keimwurzeln in ein und dieselbe Richtung zeigten. Nachdem die Samen in eine etwa 3 mm dicke Agarschicht eingegossen waren, wurden die PETRI-Schalen in umgekehrter, schrägstellter Lage bei 28° C bebrütet. Die Agarschicht bestand aus einem Hefe-Pepton-Nährboden folgender Zusammensetzung: Hefeauteoly sat; 0,5% Pepton; 0,5% NaCl; 2% Agar; pH = 7,2.

Nach 2 Tagen keimten die Maiskörner und konnten für die eigentlichen Versuche entnommen werden. Die nur in Ausnahmefällen aufgetretenen Fremdinfectionen konnten schon nach einem Tage auf dem für Pilze und Bakterien günstigen Nährboden erkannt werden.

Trotz der zuverlässigen Sterilisationsmethode waren mehrfach nach der Quellung ganze Ansätze, meist etwa 50—100 Erbsen bzw. Maiskörner, mit Bakterien infiziert. Aus verschiedenen Gründen erschien die Annahme berechtigt, daß der Fehler nicht in der Methode lag, sondern daß in den betreffenden Fällen Bakterien aus dem Innern der Samen frei geworden waren, die sich auf Kosten von Samenausscheidungen vermehrten [STILLE (2)] und dadurch die zuvor äußerlich sterilen Samen infizierten. Denn Infektionen traten nur dann auf, wenn die Keimung schon während der Durchlüftung einsetzte und die Keimwurzeln die Samen- bzw. Fruchtschale durchbrochen hatten. Wurde die Durchlüftung nach maximaler Quellung vor dem Durchbruch der Keimwurzeln beendet, so erwiesen sich die Ansätze normalerweise als steril.

Um diesen Schwierigkeiten zu begegnen, wurde versucht, unter nichtsterilen Bedingungen vorgequollene Samen zu sterilisieren und nach der Sterilisation direkt in PETRI-Schalen auskeimen zu lassen. Es konnte so eine absolute Oberflächensterilität erreicht werden, doch war die Keimfähigkeit (bei Erbsen) um etwa 20% herabgesetzt. Daher wurde von dieser Methode weiter kein Gebrauch gemacht, weil für die Wurzel- bzw. Pflanzenkulturen möglichst ungeschädigte Samen verwendet werden sollten. Es mußte also für die Gewinnung steriler Samen jeweils auf rechtzeitige Beendigung der Durchlüftung und Quellung geachtet werden.

In diesem Zusammenhange sei bemerkt, daß auch bei Besitz der vollen Keimfähigkeit die desinfizierten Samen gegenüber unbehandelten leichter von Mikroorganismen überwuchert werden, wenn man sie unter nichtsterilen Bedingungen auskeimen läßt. Das wird durch Herabsetzung der jeder Zelle mehr oder weniger eigenen Vitalinhibition¹ verursacht. Die äußersten Zellschichten des Samens werden bei dem Sterilisationsgang abgetötet und stehen den Mikroorganismen als Nährstoffquelle zur Verfügung. Bei der in Abschnitt II beschriebenen Kulturmethode steril vorgezogener und anschließend beimpfter Pflanzen ist dieser Punkt besonders berücksichtigt worden. Von DOLD wurde die Vitalinhibition mit Sterilisationsversuchen an Kartoffeln in sehr einfacher und überzeugender Weise demonstriert.

Nach Abschluß der eigenen Untersuchungen wurden 2 von der Firma Henkel, Düsseldorf, hergestellte Verbindungen vom Typ quartärer Ammoniumsalze auf ihre Brauchbarkeit zur Sterilisation von Samen überprüft. Bei großer Oberflächenaktivität und gleichzeitig bactericider Wirkung erwiesen sich die Stoffe als gut geeignet. Es konnte volle Außensterilität schon bei Konzentrationen und Einwirkungszeiten erreicht werden, die weit unter der Grenze der Keimschädigung lagen, z. B. mit einer 1%igen Alkyl-dimethyl-benzyl-ammoniumchlorid-Lösung nach einer Einwirkungsdauer von 10 min.

Da sich die Aufzucht steriler Pflanzen mit der Frage der inneren Sterilität von Samen als eng verknüpft erwiesen hatte, wurden folgende Versuche durchgeführt.

Die innere Sterilität von Samen und parenchymatischen Pflanzengeweben.

Zur Frage der inneren Sterilität von Samen und Früchten liegen zahlreiche Untersuchungen vor. Über das Vorkommen von Pilzen arbeiteten NIETHAMMER und MARCUS. Untersuchungen über den Gehalt an Bakterien sind mehrfach im Zusammenhang mit der Nachprüfung der vor allem von SCHANDERL gemachten Beobachtungen durchgeführt worden. Zusammenfassend hat darüber BURCÍK berichtet. Von neueren amerikanischen Autoren seien erwähnt: SANFORD, der im inneren Gewebe von Stamm und Wurzel bei Kartoffeln, Luzerne und Klee eine gemischte Bakterienflora fand und TERVET u. HOLLIS, die aus gesunden Speicherorganen Bakterien isolieren konnten.

Abgesehen von einigen Versuchen, die der nochmaligen Überprüfung der vor allem von SCHANDERL aufgestellten Behauptung über eine Regeneration von „Bakterioiden“ aus Pflanzenzellen dienen sollten, war mit den im folgenden beschriebenen Versuchen die Klärung einiger spezieller Fragen beabsichtigt: 1. interessierte die Lokalisation der aus dem Innern von Samen zu isolierenden Keime, 2. deren quantitative Erfassung, 3. die Verhältnisse in parenchymatischen Geweben und 4. das Vorkommen von *Bacterium radicicola* in Leguminosensamen.

Methodik.

Zur Durchführung der Versuche wurde eine sehr einfache Methode entwickelt. Sie erlaubte es, das zu untersuchende Material, das in jedem Einzelfall auf Außensterilität überprüft wurde, im gleichen Gefäß ohne Infektionsmöglichkeiten zu

¹ Es ist damit die keimvermehrungshemmende Kraft gemeint, die lebende Zellen Mikroorganismen gegenüber entfalten.

zerstoßen und somit die innere Sterilität oder Infektion einwandfrei zu ermitteln (Abb. 2). Der Arbeitsgang war bei allen Versuchen im Prinzip folgender:

1. Die Kulturgefäße wurden mit der für die Isolierung der Bakterien vorgesehene Nährlösung bei 1,5 atü $\frac{1}{2}$ Std autoklaviert.

2. Das Samenmaterial wurde unmittelbar nach der Bromsterilisation und anschließendem Spülen mit sterilem Wasser in die Kulturgefäße überführt.

3. Das Bebrüten der Kulturen erfolgte eine Woche lang bei 25—30° C. Daß eine längere Zeit nicht notwendig war, ging aus den Versuchen von BURCIK hervor. Die eigenen Beobachtungen sprachen ebenfalls dafür: kam überhaupt Bakterien-

entwicklung in Gang, dann spätestens nach 3—4 Tagen¹. Die infolge von Bakterienwachstum getrübten Röhrchen schieden für die weitere Untersuchung aus. Damit war auch die Frage einer unbedingt sterilen Überführung der Samen in die Kulturgefäße prinzipiell ohne Bedeutung.

4. Die steril gebliebenen Röhrchen wurden mit einer Schraubklemme unterhalb des Wattestopfens abgedichtet, das zu zerstoßende Material innerhalb des Gummischlauches (siehe Abb. 2) von außen mit einem Hammer zertrümmert und der Gewebebrei in das Reagensglas zurückgespült.

5. Es erfolgte erneutes Bebrüten des zerstoßenen Materials, eine Woche lang bei 25—30° C und anschließend die Prüfung auf Sterilität durch Ausgießen des Röhrcheninhaltes in eine PETRI-Schale, in der eine Durchmischung und Verfestigung mit Nähragar durchgeführt wurde. Waren aus dem Gewebebrei des zertrümmerten Materials Bakterien frei geworden, mußte es zu einer Massenentwicklung kommen, da sich die Bakterien schon eine Woche lang in der Nährlösung des Kulturröhrchens hatten vermehren können (geeignete Nährboden-Verhältnisse vorausgesetzt!). Die Bakterienentwicklung wurde meist schon in den Röhrchen selbst, trotz der durch den Gewebebrei verursachten Trübung, erkannt.

Abb. 2. Kulturgeäß für Sterilitätsprüfung.

In Abhängigkeit von dem jeweiligen Versuchszweck wurde das oben beschriebene Arbeitsschema modifiziert. Die Art der verwendeten Nährböden und andere vom Schema abweichende Einzelheiten sind bei dem betreffenden Versuch angegeben. Jede Versuchsserie wurde mit 50 Kulturgefäßen angesetzt. Das untersuchte Erbsenmaterial stammte aus einer Ernte (Sorte: Grüne Viktoria).

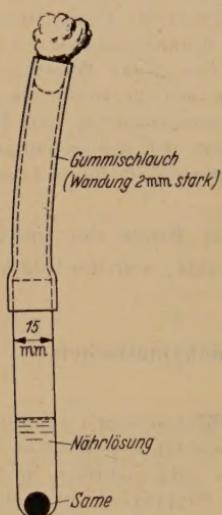
Kontrollversuche ohne Samen ergaben — bei Anwendung der oben beschriebenen Manipulationen — für sämtliche Kulturröhrchen Sterilität. Damit wurde gezeigt, daß das Autoklavieren auch an der Innenwandung des Gummischlauches volle Sterilität gewährleistet und die mechanische Bearbeitung ohne Einfluß ist.

Durchgeführte Versuche.

1. Ermittlung der Infektionsrate des untersuchten Materials.

Voll keimfähige Samen wurden unmittelbar nach dem Sterilisationsvorgang in Kulturgefäße mit je 6 cm³ gepufferter Bouillonnährösung überführt. Als Puffer wurde eine Citronensäure-Phosphat-Mischung nach McILVAINE für ein pH von 7,2

¹ Einige mit Erbsen beschickte Röhrchen aus den ersten Versuchen dieser Art waren nach über einem Jahre noch steril!



verwendet. Die Pufferung erwies sich als erforderlich, weil bei dem Zerstoßen des Samens freiwerdende Säuren das pH auf 5,5—5,8 absinken ließen und damit die Bakterienentwicklung verzögerten. In ungepufferten Nährösungen kam es nach dem Zertrümmern des Samens — im Falle einer Infektion — erst nach 2—3 Tagen und länger zu einer erkennbaren Trübung, während gepufferte Nährösungen meist schon innerhalb von 24 Std zu starker Trübung führten.

Die Prüfung auf Sterilität nach Punkt 5 des Arbeitsschemas erfolgte in der Weise, daß die Hälfte des gut durchgeschüttelten Röhrcheninhalts mit Bouillon-Agar, die andere Hälfte mit Glycerin-Agar nach USCHINSKY [aus JANKE (2), S. 120] in PETRI-Schalen überschichtet wurde. Auf diese Weise konnte gleichzeitig der Einfluß des Nährbodens überprüft werden. Unabhängig vom Substrat betrug die ermittelte Infektionsrate 34,5%.

2. In dem von SCHANDERL angegebenen Bohnenwasser-Spezial-Nährboden wurde — genau wie im vorangehenden Versuch — die Infektionsrate bestimmt; sie betrug 37,5%. Die „Lösung der Symbiose“ erfolgte durch das von SCHANDERL empfohlene 15 min lange Kochen vor dem Zerstoßen. Die Sterilitätsprüfung war in PETRI-Schalen mit dem entsprechenden Bohnenwasser-Nähragar durchgeführt worden.

Von einer „Regeneration von Bakterioiden“, der Grundlage der SCHANDERLSchen Symbiosetheorie, war nichts zu bemerken. Entsprechende Versuche hatten bekanntlich bei SCHANDERL 100%ig zu Bakterienentwicklung geführt. Durch die eigenen Ergebnisse werden nur die bereits von RIPPEL-BALDES (1), BURCIK u. a. mitgeteilten Ergebnisse bestätigt. Auch in diesem Falle konnte gezeigt werden, daß der Nährboden von untergeordneter Bedeutung ist, sofern dieser eine Entwicklung der im Sameninnern vorkommenden Bakterien überhaupt zuläßt.

3. Zur Klärung der Frage, von wieviel Keimen des Sameninnern die Entwicklung ausging, diente folgender Versuch:

50 Erbsen wurden nach gemeinsamem Sterilisieren in die Kulturröhrchen überführt, 25 davon sofort zerstoßen und die Sterilitätsprüfung des Gewebebreies unmittelbar darauf vorgenommen. Als Nährlösung diente gepufferte Bouillon. Die PETRI-Schalen wurden mit Cellophanstreifen abgedichtet, um Fremdinfectionen restlos auszuschalten. Nach 3 Tagen waren auf 8 Platten 1—2 Kolonien gewachsen; die anderen blieben auch nach weiterem Bebrüten steril. Die Infektionsrate betrug somit 32% (8 auf 25). Um die Außensterilität der hier benutzten Samen indirekt zu beweisen, wurden die restlichen 25 Erbsen 7 Tage lang bebrütet. Es waren keine Infektionen zu beobachten. Daraufhin wurde auch dieses Material auf Bakteriengehalt im Innern geprüft. Nach 3 Tagen konnte auf 10 Platten die Entwicklung von durchschnittlich 5—10 Kolonien beobachtet werden, was einer Infektionsrate von 40% entspricht.

Die immer wiederkehrenden Infektionsraten von 30—40% können als Stütze für die Richtigkeit der Versuchsergebnisse angesehen werden. Da weiter je Samen — im Falle einer Infektion im Innern — nur bis zu 10 Keime festgestellt wurden, kann es sich nicht um ein allgemeines Vorkommen handeln, sondern nur um zufällige Infektionen, wie sie auch BURCIK nachgewiesen hat.

4. Die Frage der Lokalisation der Bakterien in der Erbse wurde mit folgendem Versuch geklärt:

Sterilisierte Erbsen wurden einen Tag lang unter steriler Durchlüftung vorquollen. Die infolge der Quellung von den Kotyledonen gelockerte Samenschale wurde dann unter sterilen Arbeitsbedingungen abgelöst und zusammen mit den dazu gehörenden Kotyledonen in die Bouillon-Kulturröhren überführt. Nach 7 tägigem Bebrüten waren 20 von den angesetzten 50 Kulturröhren stark getrübt; das entspricht einer Infektionsrate von 40%. Die zur Entwicklung gelangten Keime können sich nur zwischen Kotyledonen und Samenschale aufgehalten haben, oder sie müssen durch Fremdinfection während der Manipulation in das Kulturröhren gelangt sein. Da die Infektionsrate von der erwarteten Größenordnung war, kann jedoch Fremdinfection weitgehend ausgeschlossen werden. Die steril gebliebenen 30 Samen wurden zerstoßen, 7 Tage lang bebrütet und in der üblichen Weise auf Sterilität geprüft.

In nur einem Fall trat Bakterienentwicklung ein (d. h. bei 3%). Wegen dieses Befundes wurde eine entsprechende Wiederholung durchgeführt, bei der 4 von 35 Samen (d. h. 11,4%) nach dem Zerstoßen der äußerlich sterilen Kotyledonen zu Bakterienentwicklung führten.

Obwohl das Vorkommen von Bakterien auch im Gewebe der Kotyledonen durchaus mit der Vorstellung der durch die Blütenmarke erfolgenden Infektion des Sameninnern zu vereinbaren ist, zeigten die eigenen Ergebnisse, daß bei dem größeren Teil des untersuchten Materials die Bakterien zwischen Samenschale und Kotyledonen lokalisiert waren. Gelangen Bakterien — was von BURCIK nachgewiesen werden konnte — mit dem auswachsenden Pollenschlauch in den Nucellus der Samenanlage, dann ist die Lokalisation leicht zu verstehen: Nach der Befruchtung wird das Nucellusgewebe resorbiert und zum Aufbau von Embryo und Kotyledonen verwandt. Die Bakterien werden vereinzelt von dem Kotyledonengewebe umwachsen, bleiben jedoch normalerweise außerhalb des Embryos zurück und gelangen schließlich zwischen die Kotyledonen und die sich aus den Integumenten bildende Samenschale; das Nucellusgewebe wird bei den Leguminosen restlos resorbiert und ein Endosperm bzw. Perisperm nicht ausgebildet. Bei anderen Samen können die Verhältnisse durchaus anders liegen.

Die Tatsache, daß auch die Oberfläche der Samenschale — wie BURCIK bei *Vicia Faba* zeigen konnte — selbst bei steriler Entnahme aus den Hülsen mit Bakterien infiziert sein kann, läßt sich durch die Annahme erklären, daß die Bakterien mit dem Pollenschlauch zum Teil nur bis in das Innere des Fruchtblattes gelangen und schließlich auf den Samen oder der Innenwandung der Hülse verbleiben.

Durch diese Ergebnisse wurde klar, warum Vorversuche zur sterilen Aufzucht von Erbsen in Wasserkultur — bei gleichzeitig 20—30 Samen je Kulturgefäß — trotz äußerlich einwandfrei steriler Samen und geeigneter Apparaturen mißlungen waren: Im Verlauf der Pflanzenentwicklung mußten die Bakterien zwangsläufig aus dem Sameninnern in die Kulturlösung gelangen.

5. Es interessierte die Frage, ob aus dem Innern von Erbsen *Bacterium radicicola* zu isolieren war.

Bei den bisher durchgeführten Versuchen hätte es allein schon wegen der Nährbodenverhältnisse nicht erfaßt werden können. Daher wurde der Versuch mit einem Spezialnährboden angesetzt (nach FRED, BALDWIN u. MCCOY, Nitrat-Mannit-Nährboden, S. 41). Der Arbeitsgang dieses Versuchs war wie bei den Versuchen 1 und 2. Ein Kontrollröhren wurde nach dem Zerstoßen des Samens mit einer Reinkultur von *B. rad.* beimpft und genau so weiterbehandelt wie die unbeimpften Samen.

Nur die Kontrolle zeigte Entwicklung des Bakteriums. In allen anderen Fällen blieben die Platten steril.

Ob nicht gelegentlich *Bact. radicicola*, wie andere Bakterien, bei der Befruchtung mit „eingeschleppt“ werden kann, müßte durch weitere Versuche dieser Art bei dem verschiedensten Material erst noch sichergestellt werden. Ganz und gar unwahrscheinlich ist es jedoch, daß sich in Leguminosensamen — wie es SCHANDERL dargestellt hat — normalerweise Millionen entwicklungsähiger Keime befinden, und daß die Knöllchenbakterien aus dem Innern des Wurzelgewebes in die Knöllchen auswandern.

6. Bei der Untersuchung von Pflanzengeweben auf ihre Sterilität im Innern ist man bislang allgemein von Samen, Früchten und Speicherorganen ausgegangen. SCHANDERL hat aus den nicht bestätigten Ergebnissen, die mit Geweben dieser Art gewonnen wurden, auf entwicklungsähige Keime in allen pflanzlichen Zellen geschlossen. Abgesehen davon, daß diese Verallgemeinerung nicht gerechtfertigt ist [siehe Entgegnungen von RIPPEL-BALDES (2) und BURCIK], darf nicht vergessen werden, daß die untersuchten Speichergewebe nicht ohne weiteres mit parenchymatischen Geweben gleichzusetzen sind. Aufgabe des folgenden Versuches sollte es daher sein, äußerlich sterile parenchymatische Wurzel- und Stengelgewebe auf ihren Bakteriengehalt hin zu untersuchen.

Von steril ausgekeimten Maiskörnern bzw. Erbsen wurden 2 cm lange Wurzeln oder etwa 1 cm lange Sprosse abgeschnitten und nach erwiesener Außensterilität auf ihre Sterilität im Innern geprüft. Das Ergebnis war folgendes:

a) Eine Versuchsserie mit 50 Kulturgefäßen und je 3—5 äußerlich sterilen Wurzeln ergab im Innern 100%ige Sterilität.

b) Die entsprechende Versuchsreihe mit äußerlich sterilen Sprossen ergab ebenfalls im Innern 100%ige Sterilität. (Für a und b wurde Bouillon-Nährlösung verwandt.)

c) Auch die Anwendung von Bohnenwasser und „Lösung der Symbiose“ — wie im Versuch Nr. 2, S. 7 — ergab für mehr als 100 geprüfte sterile Erbsenwurzeln im Innern 100%ige Sterilität.

7. Für das bei den später beschriebenen Versuchen benutzte Maismaterial wurde die Gesamtinfektionsrate in Bohnenwasser mit 25% ermittelt.

Diese Ergebnisse lassen die Schwierigkeiten erkennen, die einer absolut sterilen Pflanzenkultur entgegenstehen. Bei den folgenden Untersuchungen konnten die gewonnenen Erkenntnisse weitgehend ausgenutzt werden.

I. Die Beziehungen zwischen Mikroorganismen und *in vitro* kultivierten Pflanzenwurzeln.

Nachdem Methoden für die Kultur abgeschnittener, isoliert wachsender Wurzeln entwickelt waren, haben KRASSILNIKOW (1) sowie KANDLER den Versuch gemacht, mit Hilfe dieser sogenannten Organkulturen die Beziehungen zwischen Mikroorganismen und Wurzeln zu untersuchen. Das Ergebnis kann wie folgt zusammengefaßt werden: Bei Anwesenheit von Bakterien in dem für die Wurzelkulturen notwendigen Substrat wird das Wachstum isolierter Wurzeln grundsätzlich unterdrückt. Bakterienfiltrat wirkt in starken Konzentrationen hemmend und soll in geringen Konzentrationen fördernde Wirkung zeigen. Nach KANDLER handelt es sich dabei um eine Heterauxin-Wirkung.

Eigene Versuche konnten diese Beobachtungen in gewissem Umfang bestätigen. Nach Beimpfung isoliert wachsender Maiswurzeln mit den aus der Maisrhizosphäre isolierten Mikroorganismen wurde das Wurzelwachstum in allen Fällen verhindert.

Die Organismen wurden aus dem Wurzelbereich einer kurz vor der Blüte stehenden Maispflanze (Sorte Mahndorf) mit Hilfe des KOCHSchen Plattenverfahrens isoliert. Die Anwendung von Bouillon und Würze brachte naturgemäß eine Einschränkung der erfaßbaren Mikroorganismen mit sich. Auf die Einbeziehung von Spezialisten — wie z. B. Cellulosezersetzern und Anaeroben — wurde bewußt verzichtet, um die Untersuchungen nicht zu komplizieren. Es wurden die nachstehend aufgeführten Organismen isoliert (Bestimmung nach BERGEY):

Bakterien:

B 1 <i>Achromobacter</i> sp.	B 8 <i>Bac. laterosporus</i>
B 2 <i>Flavobacter</i> sp.	B 9 <i>Bac. fulminans</i>
B 3 <i>Bac. adhaerens</i> -Gruppe	B 10 <i>Bac. circulans</i> -Gruppe
B 4 <i>Bac. mycoides</i>	B 11 <i>Bac. agri</i>
B 5 <i>Bac. elegans</i>	B 12 <i>Bac. fusicularis</i>
B 6 <i>Bac. adhaerens</i> -Gruppe	B 13 <i>Bac. fusiformis</i> (vermutl.)
B 7 <i>Bac. brevis</i> -Gruppe	

Proactinomyceten:

A 1 <i>Proactinomyces</i> sp.
A 2 <i>Proact. coeliacus</i>

Pilze:

H 1 <i>Candida</i> sp.
P 1 <i>Penicillium</i> sp.
P 2 <i>Humicola</i> sp.
P 3 <i>Penicillium</i> sp.

Im folgenden werden nur die Stammbezeichnungen benutzt.

Einige Autoren — u. a. ISAKOWA u. SMIRNOWA — sind für eine spezifische Zusammensetzung der Rhizosphärenflora eingetreten; hinsichtlich niederer *Phycomyceten* vgl. REINBOLDT. Andere Versuchsergebnisse sprechen dagegen und weisen auf eine Stimulierung der allgemeinen Bodenmikroflora im Bereich von Pflanzenwurzeln hin (STILLE 1). Sicher wird weder das eine, noch das andere als Extrem verwirklicht sein. Die besonderen Verhältnisse in Wurzelnähe bieten zwangsläufig

für gewisse Organismen besonders günstige Entwicklungsmöglichkeiten; andererseits wird man in der Rhizosphäre nicht bestimmte Arten von Mikroorganismen erwarten können, die nicht auch im wurzelfreien Boden anzutreffen sind, sondern höchstens eine Anreicherung bestimmter Typen. Es wird auf diese Frage noch zurückzukommen sein (S. 16).

Die Wurzelkulturen wurden in der von WHITE angegebenen rein synthetischen Nährlösung gezogen (je 25 cm³ in 100er E. K.). Der Zusatz von steriles Bakterienfiltrat bewirkte eine deutliche Hemmung, die mit steigender Konzentration zunahm. Das zeigte folgender Versuch: B 10 wurde auf dem von KANDLER benutzten Substrat 12 Tage kultiviert und anschließend steril filtriert; das Filtrat in verschiedenen Konzentrationen der gleichen, aber unbewachsenen Nährlösung zugesetzt und mit 1% Agar Schrägröhrchen für die Kultur abgeschnittener Wurzelspitzen hergestellt (vgl. Tab. 1).

Um unter gleichen Bedingungen ein möglichst gleichmäßiges Wurzelwachstum zu erreichen, wurde — wie von BURLET empfohlen — das Samenmaterial eines Maiskolbens (ohne die extrem großen bzw. kleinen Körner) verwendet. Es konnte so mit weitgehend einheitlichem Material gearbeitet werden.

Tabelle 1. *Wirkung von Bakterienfiltrat auf das Wachstum isolierter Maiswurzeln.*

	Wurzelzuwachs mm	Relative W.-Länge in %	Hemmwert in %
Kontrolle	58	100	—
Filtratkonzentration in der Nährlösung 1 : 10 .	32	55,2	44,8
1 : 5 .	25	43,1	56,9

(Es handelt sich um Durchschnittswerte aus je 25 Kulturen.)

Nach KANDLER soll allgemein Heteroauxin (H. A.) für die Hemmung verantwortlich sein. Seine Bildung durch Mikroorganismen, namentlich durch Schimmelpilze, ist mehrfach nachgewiesen worden [JANKE (1); SCHOPFER]. KANDLER nimmt nun an, daß durch die relativ gute Entwicklung der Mikroorganismen in dem für Wurzelkulturen erforderlichen Substrat hohe Wirkstoffkonzentrationen auftreten, die das Wachstum hemmen. Im Boden soll dagegen infolge schwächerer Bakterientwicklung die Wirkstoffproduktion in der Regel auf Mengen beschränkt bleiben, die für die Wurzel förderlich sind. Bei den von KANDLER benutzten Bakterienstämmen wurde die H. A.-Bildung chemisch nicht nachgewiesen.

Da wir vermuteten, daß nicht nur H. A., sondern auch andere Stoffwechselprodukte für die beobachtete Wachstumshemmung verantwortlich sein könnten, wurden Versuche durchgeführt mit dem Ziel, das gebildete H. A. chemisch nachzuweisen. Dazu wurde zunächst 1 l der von WHITE angegebenen voll synthetischen Nährlösung, der zur Verbesserung

der Wachstumsbedingungen noch 0,05% Asparagin und 0,02% Ammonium-Lactat zugesetzt wurden, mit dem Bakterienstamm B 10 beimpft und bei 28°C in Durchlüftungskultur 12 Tage lang bebrütet. Starke Trübung der Nlsg. am Ende der Bebrütungszeit zeigte eine gute Bakterienentwicklung an. Dann wurden für die Ermittlung der wachstums-hemmenden Wirkung dieser Nährösung bestimmte Mengen zu unbewachsener WHITESCHER Nlsg. zugesetzt und Röhrchen für die Kultur abgeschnittener Wurzeln hergestellt. Insgesamt wurden 5 Serien mit je 25 Reagensgläsern vorbereitet, die die bewachsene Nlsg. in Konzentrationen von 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 und 1 : 10000 enthielten.

Die Röhrchen wurden bei 1,2 atü sterilisiert und mit steril gewonnenen Erbsenwurzelspitzen beschickt (durchschnittliche Länge 1 cm). Nach einer Kulturdauer von 12 Tagen (bei 28°C) ergaben sich die in Tab. 2 verzeichneten Zuwachswerte:

Tabelle 2. Wirkung von Bakterienfiltrat auf das Wachstum isolierter Erbsenwurzeln

	Zuwachswerte mm	Relative Wurzel-länge in %	Hemmwerde in %
Kontrollen:	33,0	100	—
Bakterien-Nährösungen in Konzentration			
1 : 10	23,7	71,8	28,2
1 : 100	28,2	85,5	14,5
1 : 1000	31,2	94,5	5,5
1 : 10000	32,1	97,3	2,7

(Auch hier handelt es sich um Durchschnittswerte aus jeweils 25 Kulturen.)

Bei einer Konzentration von 1 : 100 ergab sich somit noch eine deutliche Wachstumshemmung von 14,5%. Da nach FIEDLER reines H. A. in einer Konzentration von 10 γ im Liter auf isolierte Wurzeln wachstums-hemmend wirkt und nach GEIGER-HUBER eine fördernde Wirkung bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-11}$ molar zu beobachten ist (0,01 γ/cm³ also hemmend und 0,005 γ/cm³ fördernd wirken), mußte in der getesteten Bakterien-Nlsg. auf Grund der bei 1 : 100 beobachteten Hemmung die hundertfache Menge im cm³, also 1 γ/cm³ erwartet werden. Für den chemischen Nachweis standen 600 cm³ Nlsg. zur Verfügung, in denen demnach etwa 600 γ H. A. enthalten sein mußten.

Für die Analyse wurde die von MITCHELL u. BRUNSTETTER angegebene Ferrichlorid-Schwefelsäure-Reaktion benutzt. Das H. A. wurde aus saurer Lösung mit Äther extrahiert, auf 10 cm³ eingeengt und mit 2 n-Sodalösung ausgeschüttelt. Mit diesem Konzentrat wurde die Reaktion angestellt. Die Empfindlichkeit mit reiner H. A.-Lösung war zu 10 bis 50 γ/cm³ ermittelt worden.

In einem Vorversuch konnten 100γ H. A., die zu 600 cm^3 entsprechender Nlsg. zugegeben waren, nach dem angegebenen Verfahren eindeutig nachgewiesen werden. Die auf Wurzelkulturen hemmend wirkende Bakterienährlösung, in der etwa 600γ zu erwarten waren, ergab jedoch eine negative Reaktion. Das Ergebnis zeigt, daß — zumindest bei dem untersuchten Stamm — Heterauxin nicht als Ursache für die Wachstumshemmung der isoliert wachsenden Wurzeln in Frage kommen konnte, sondern irgendwelche anderen Stoffwechselprodukte unbekannter Natur dafür verantwortlich gemacht werden müssen.

Daß die an isolierten Wurzeln gewonnenen Ergebnisse ganz allgemein nicht auf die Wurzeln ganzer Pflanzen übertragen werden können, geht eindeutig aus dem folgenden Versuch hervor: Wurde dasselbe Bakterienfiltrat (wie bei den Wurzelkulturen S. 11) in den entsprechenden Konzentrationen sterilen Pflanzenkulturen¹ zugegeben, so erreichten die Wurzellängen bei einer Kulturdauer von 12 Tagen folgende Durchschnittswerte (Tab. 3):

Tabelle 3. *Wirkung von Bakterienfiltrat auf das Wachstum von Wurzeln steriler Pflanzenkulturen (Mais).*

	Zuwachs- wert cm	Relative Wurzel- länge in %	Hemmwert in %
Kontrolle	21	100	—
Filtrat 1 : 10	18	85,7	14,3
Filtrat 1 : 5	14	66,7	33,3

Die Hemmwerte waren bei den sterilen Pflanzen somit beträchtlich geringer als bei den entsprechenden Wurzelkulturen (S. 11). Die Schädigung isolierter Wurzeln durch Bakterienstoffwechselprodukte ist also bedeutend größer.

Die mit Wurzelkulturen durchgeführten Versuche — und das beweisen meines Erachtens alle bisherigen Ergebnisse — sind ungeeignet, in die Verhältnisse der gegenseitigen Beeinflussung von Mikroorganismen und Pflanzenwurzeln einen Einblick zu ermöglichen. Bei den gegebenen Nährbodenverhältnissen ist auch nichts anderes zu erwarten, weil das Substrat in gleicher Weise für die Entwicklung von Pilzen und Bakterien gut geeignet ist. Es kommt zu einer Massenentwicklung der Mikroorganismen, die zwangsläufig zu einer Schädigung der Wurzel führt, sei es nun durch H. A., irgendwelche anderen wirksamen Stoffwechselprodukte, durch Nährstoffentzug oder noch andere Faktoren.

Es sei erwähnt, daß sich eine getrennte Versorgung der isoliert wachsenden Wurzeln mit den erforderlichen organischen und mineralischen

¹ Die Methode der sterilen Pflanzenkultur wird erst im nächsten Abschnitt beschrieben.

Nährstoffen grundsätzlich als möglich erwies (siehe Abb. 3), daß durch die Beimpfung des nur mit Salzen versorgten Wurzelteiles jedoch gleichfalls keine geeigneten Verhältnisse gegeben waren, um die Beziehungen zwischen Mikroorganismen und Pflanzenwurzeln aufzuklären. Aus diesem Grunde sei hier auf eine nähere Beschreibung der Versuche verzichtet (siehe Anm. S. 1) und gleich zu den mit sterilen Maispflanzen durchgeführten Untersuchungen übergegangen.

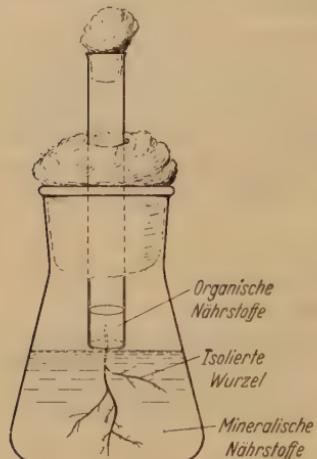


Abb. 3.

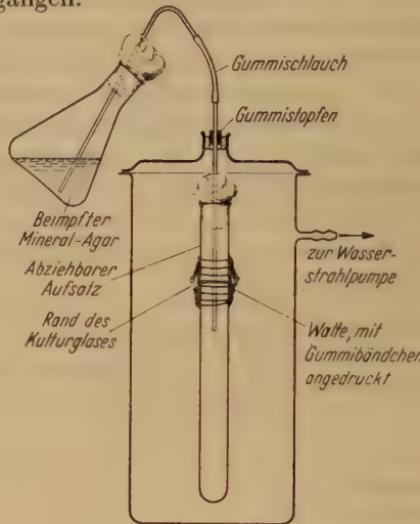


Abb. 4.

Abb. 3. Wurzelkultur bei getrennter Versorgung mit organischen und mineralischen Nährstoffen (schematisch). Die Beimpfung erfolgte in dem rein mineralischen Bereich, der durch einige Millimeter Zwischenraum von den organischen Nährstoffen getrennt war.

Abb. 4. Anordnung für die Überführung des beimpften Mineral-Agars in die Kulturgefäße.

II. Das Verhalten von Mikroorganismen in sterilen Pflanzenkulturen.

1. Die Entwicklung von Mikroorganismen in der Rhizosphäre.

Wie die Versuche über innere Sterilität gezeigt haben, kann diese einem äußerlich sterilen Samen nicht angesehen werden. Da andererseits die Keimwurzel — bei Maiskörnern unter dem Schutz der Coleorhiza — aus dem Innern normalerweise steril austritt (die Gewinnung steriler Wurzeln für Organkulturen wäre sonst auch gar nicht möglich!), mußte bei den Pflanzenversuchen dafür gesorgt werden, daß der Same möglichst ohne Berührung des Substrats lufttrocken gehalten wurde, so daß sich bei Nichtbeimpfung ein absolut steriles Wurzelsystem entwickeln konnte. Das ließ sich in einem 1% igen Mineralagar erreichen: Bei der Überführung der gekeimten Körner wurden die 1—2 cm langen Wurzeln nur etwa bis zu halber Länge in den Agar eingedrückt; das Maiskorn selbst blieb ohne Berührung mit dem Substrat. Auf diese Weise wurde gleichzeitig der Einfluß der Samenausscheidungen [STILLE (2)] ausgeschaltet und

eine Übervermehrung der eingeimpften Organismen, wie sie auf sterilisierten Samen allgemein zu beobachten ist, verhindert. Als Impfmaterial dienten die aus der Maisrhizosphäre isolierten Organismen.

Die Versuche wurden so angestellt, daß sich das Wurzelsystem in einem gleichmäßig beimpften Substrat entwickeln mußte. Der Versuchsgang war folgender:

1. Eine gleichmäßige Verteilung der Organismen wurde dadurch erreicht, daß der für die Pflanzenkultur vorgesehene Mineralagar für sich sterilisiert, mit einer Aufschwemmung des betreffenden Organismus gut durchgemischt und vor dem Erstarren in das sterile Kulturgefäß überführt wurde. Hierzu dienten große Reagensgläser von 18×2 cm, die mit dem beimpften Nährboden bis nahezu an den Rand gefüllt wurden (siehe Abb. 4).



Abb. 5. Anreicherung von B6 (*Bac. adhaerens*-Gruppe), 7 Tage alte Maiskultur, Übersichtsbild. Bei → abgestorb. Rindenzelle. Vgr. 285×.



Abb. 6. Anreicherung von B9 (*Bac. fulminans*) in 12 Tage alter Kultur. In der Mehrzahl vegetative Zellen, z. T. wieder verspore. Vgr. 360×.

2. Die gekeimten, äußerlich sterilen Maiskörner wurden unter sterilen Bedingungen in die Kulturgefäße überführt.

3. War der Sproß bis unter den Stopfen gewachsen, wurde der Aufsatz (Abb. 4!) abgezogen, die Watte fest angedrückt und mit einem Gummiband eine eventuelle Lockerung der Watte verhindert. Auf diese Weise wurden sekundäre Infektionen des Wurzelsystems ausgeschlossen, während sich der Sproß außerhalb des Kulturgefäßes entwickeln konnte.

Als Substrat diente ein 1%iges Mineralagar (aus Knop- u. AZ-Lösung), das heiß durch Watte filtriert wurde, um ein optisch klares Medium zu gewinnen. Bei der Mehrzahl der Versuche wurde ausgefaultes Agar verwendet, da dieses nahezu nährstofffrei ist und deshalb eine Nährstoffwirkung auf die Mikroorganismen ausgeschlossen werden konnte. Beimpft wurde mit 3—4 Wochen alten Pilz- u. Bakterienkulturen. In etwa 10—14 Tagen hatte sich das Wurzelsystem der jungen Maispflanzen kräftig entwickelt, die Sproßlängen betrugen 30 cm und mehr.

Das Verhalten der eingeimpften Mikroorganismen an den Pflanzenwurzeln wurde während der Kulturdauer, die meist nach 14 Tagen beendet wurde, laufend mikroskopisch verfolgt. Die Abb. 5—7 zeigen Verhältnisse im Bereich der Wurzelhaare, wie man sie regelmäßig antrifft. Die Organismen an den Wurzeln konnten direkt im Kulturgefäß mikroskopisch beobachtet werden.

Die Mikroaufnahmen der Abb. 5 und 6 wurden auf diese Weise hergestellt, während für die Abb. 7a und 7b das gesamte Agar mit dem Wurzelsystem vorsichtig aus dem Reagensglas herausgezogen wurde und 1—2 mm dicke, Wurzeln enthaltende Agarscheiben als Präparate dienten. Diese wurden nicht gefärbt, um eine eventuelle Veränderung in der Lokalisierung der Organismen zu verhindern. Unter diesen Voraussetzungen konnten aus phototechnischen Gründen, insbesondere bei starken Vergrößerungen, keine sehr scharfen Aufnahmen erhalten werden, dafür aber um so zuverlässiger.

In Abb. 5 ist eine freiliegende, abgestoßene Rindenzelle zu erkennen (durch → bezeichnet); man sieht, daß um sie keine besonders intensive



Abb. 7a. Anreicherung von B 6 an sehr jungen Wurzelhärrchen, 7 Tage alte Kultur. Vergr. 560×.



Abb. 7b. Fortgeschrittenes Stadium in derselben Kultur. Vergr. 560×.

Anreicherung zu beobachten ist. Auch LINFORD hat bei abgestoßenen Calyptra- u. Rindenzellen dieselbe Feststellung gemacht. Das spricht dafür, daß die Anreicherung von Bakterien nicht allein von der Zerstörung und Ausnutzung von totem oder absterbendem Zellmaterial abhängt. Die Abb. 7a und 7b zeigen fortlaufende Entwicklungsstadien in derselben Kultur.

Aus zahlreichen Beobachtungen ergab sich für das Verhalten der Organismen an den Wurzeln der Maispflanzen folgendes Bild: Für die Anreicherung waren in quantitativer Beziehung alle Übergänge vertreten, von der praktisch fehlenden Vermehrung bis zu einer teilweise schon makroskopisch erkennbaren Entwicklung. Unter den gegebenen Kulturbedingungen war eine gleich intensive Vermehrung für alle Stämme auch nicht zu erwarten, da bekanntlich bei gleichen Ernährungsbedingungen infolge der verschiedenen Ansprüche der Organismen auch das Wachstum unterschiedlich ist. Bis auf den Stamm B 8 (*Bac. laterosporus*) vermehrten sich alle Organismen mehr oder weniger gut unter dem Einfluß der Wurzeln in einer an organischen Nährstoffen freien Umgebung.

An den älteren Wurzelpartien war die Anreicherung am ausgeprägtesten, doch auch an jüngsten Wurzelteilen, insbesondere an den in der Entwicklung stehenden Wurzelhärtchen, konnte eine lokale Vermehrung der Mikroorganismen beobachtet werden (vgl. Abb. 7a u. 7b), wie sie auch STARKEY (1), LINFORD sowie WALLACE u. LOCHHEAD für die Verhältnisse der natürlichen Rhizosphäre angegeben haben.

Selbst bei starker Vermehrung der Organismen im Wurzelbereich machten die Pflanzen einen ungeschädigten Eindruck. Eine Ausnahme war bei den Pilzen P 1 u. P 3 (beide *Penicillium*-spec.) zu beobachten, die eine starke Entwicklungshemmung der Pflanze verursachten. Der Grad der Schädigung stand mit der Einsatmenge in Beziehung. P 2 (*Humicola* spec.) zeigte dagegen keine parasitären Züge und entwickelte sich auch nur sehr schwach im Wurzelbereich.

Es ist bekannt, daß unter den besonderen Bedingungen der Reinkultur Mycorhiza-Pilze, infolge der Störung des sonst durch die natürlichen Verhältnisse geregelten Gleichgewichts, zu einseitigen Parasiten werden. Nach WINTER (1) handelt es sich um eine Steigerung der Aktivität, die durch die fehlende Konkurrenz der übrigen Bodenorganismen bedingt ist. Auch völlig neutrale Pilze können in Reinkultur zu Parasiten werden. Die Rhizosphärenorganismen scheinen im Boden die Entwicklung und Angriffskraft dieser Pilze zu schwächen und so den Parasitismus zu verhindern. Wahrscheinlich ist der Abbau die Pflanze schädigender Stoffwechselprodukte in die Verhältnisse mit einbezogen.

Daß die quantitativen Unterschiede in der Anreicherung mit den verschiedenen Ernährungsansprüchen der Mikroorganismen zusammenhängen, konnte in weiteren Versuchen gezeigt werden. Die Entwicklung auf einem Mineral-Glucose-Nährboden¹ und auf einem weiteren rein synthetischen Substrat² boten deutliche Parallelen. Danach vermehrten sich — unter diesen Versuchsbedingungen! — die Organismen mit den geringsten Ernährungsansprüchen am stärksten in der Rhizosphäre. Die auf rein synthetischem, wirkstofffreiem Substrat schlecht wachsenden Mikroorganismen entwickelten sich dagegen auch relativ spärlich im Bereich der Wurzeln. Obwohl die gewonnenen Ergebnisse infolge der komplexen Bedingungen im Boden nicht ohne weiteres auf die natürlichen Verhältnisse übertragen werden können, erscheint die Folgerung berechtigt, daß durch die Tätigkeit der jungen Wurzelhaare nur für Mikroorganismen mit einfachen Ernährungsansprüchen gute Entwicklungsmöglichkeiten geboten werden, für Organismen mit komplexen Ansprüchen jedoch erst durch den Abbau abgestorbenen Pflanzenmaterials und die „Zusammenarbeit“ aller beteiligten Organismen. Im

¹ 1000 cm³ Aqua dest.; 10 g Glucose; 0,4 g KNO₃; 1 g K₂HPO₄; 5 g NaCl; 0,2 g MgSO₄ · 7 H₂O; 0,5 g (NH₄)₂PO₄. pH = 7,2.

² 1000 cm³ Aqua dest.; 10 g Mannit; 2 g Asparagin; 3 g Ammon.-Lactat; 0,2 g KNO₃; 0,2 g MgSO₄ · 7 H₂O; 0,3 g K₂HPO₄; 0,2 g NaCl; 0,1 g CaSO₄; 3 g CaCO₃. pH = 6,8.

Boden sind diese Vorgänge nicht voneinander zu trennen, laufen nebeneinander ab und machen das Geschehen in jeder Hinsicht kompliziert.

2. Wachstums-Anomalien von Wurzelhaaren unter der Wirkung von Bakterien.

Bei der Durchführung der vorher beschriebenen Versuche wurde eine Beobachtung gemacht, die zu einer Reihe weiterer Untersuchungen Anlaß gab. Bei Beimpfung mit B 10 (*Bac. circulans*-Gruppe) — in geringerem Umfang auch mit B 13 (*Bac. fusiformis*?) — traten mehr oder weniger häufig gabelförmige Verzweigungen an den Wurzelhaaren auf (Abb. 8). Da die Beobachtung regelmäßig gemacht werden konnte und sich außerdem diese beiden Stämme im Wurzelbereich am stärksten vermehrten, wurde an eine spezifisch stoffliche Wirkung der Bakterien gedacht, zumal eine formative Beeinflussung der Wurzelhaare auch durch



Abb. 8. Gabelbildung an Wurzelhaaren von Mais bei Beimpfung mit B 10 (*Bac. circulans*-Gruppe). Vergr. 380×.

Knöllchenbakterien bekannt ist. Um einen solchen Einfluß fassen zu können, wurden die Versuche mit sterilen Maiskulturen und Zusätzen von Bakterien-Filtrat (bzw. anderen Lösungen) durchgeführt. Die Einzelheiten gehen aus der Tab. 4 hervor.

Die Kulturen wurden mit 1%igem Knop-Agar ($\text{pH} = 5.7$) angesetzt und erhielten jeweils (zu 30 cm^3) einen Zusatz von 2 cm^3 der unten angegebenen Lösungen. Das Bakterienfiltrat wurde mit B 10 auf N. B. II (siehe Anm. 2, S. 17) nach 12tägiger Kulturdauer gewonnen. Jeder Versuch wurde mit 5 Parallelen angesetzt.

Tabelle 4. Wirkung von Bakterienfiltrat auf Wurzelhaare von Mais.

Zusatz von:	Aussehen der Wurzelhaare:
1. Bakterien-Filtrat, steril filtriert, nicht eingeengt	normal
2. dieselbe Nährlösung, steril, jedoch unbewachsen	normal
3. wie unter 1, aber bei 60°C auf 1 : 10 eingeengt	zum Teil deformiert und Gabelbildung
4. wie unter 2, auf 1 : 10 eingeengt	wie unter 3, jedoch überwiegend normal
5. wie unter 2, auf 1 : 50 eingeengt	abnorm verdickt und stark deformiert; Wurzelwachstum gehemmt
6. Sterile Kontrollen	bis auf vereinzelt auftretende Ansätze zu Ausbuchtungen ausschließlich normal.

Die Versuche führten zu dem Ergebnis, daß Anomalien der Wurzelhaare sowohl bei Zusatz von bewachsenen als auch unbewachsenen Bakteriennährösungen auftreten, daß die Nährösung also bei entsprechender Konzentration (4 u. 5) schon für sich allein Deformationen an den Wurzelhaaren verursacht. Unter diesen Umständen muß ein

Tabelle 5. *Wirkung von reinen Nährösungen auf Wurzelhaare von Mais.*

Nr.	Knop-N.lsg. in %	Bouillon in %	Wurzelhaare
1.	75	25	verdickt, zahlreiche Ausbuchtungen
2.	50	50	stark deformiert (Abb. 9), Wurzel stark verdickt und Wachstum gehemmt
3.	25	75	nur wenige, völlig deformierte W. H., Wurzelwachstum stark geschädigt.
4.	—	100	gar kein Wachstum der Wurzel

spezifisch wirkendes Stoffwechselprodukt des Bacteriums ausscheiden. Zumindest muß angenommen werden, daß derartige Wachstumsstörungen ebenso gut durch die in der Nährösung vorhandenen Substanzen wie durch Bakterienstoffwechselprodukte verursacht werden können. Die in Tab. 5 zusammengestellten Ergebnisse sind ein weiterer

Beweis für diese Annahme. Mit verschiedenen Pepton-Konzentrationen wurden entsprechende Ergebnisse erzielt.

Da in den vorangehenden Versuchen eine stoffliche Wirkung von seiten des Bacteriums nicht nachgewiesen werden konnte, wurden andere Faktoren variiert und die Beziehungen zum Wachstum der Wurzelhaare geprüft. Dabei ergab sich, daß Änderungen des pH-Wertes in Flüssigkeitskulturen im Bereich von 2,6—9,5 ohne Einfluß auf die Gestalt der Wurzelhaare waren. Verschiedene Agarkonzentrationen bei gleichem pH-Wert (6,0) jedoch führten im Bereich von 0,6—0,65% zu starker Deformation der Wurzelhaare, insbesondere zu Gabelbildungen.



Abb. 9. Wurzelhaar anomalien (Mais) bei 50%iger Bouillon-Kultur (Tab. 5 Nr. 2). Vergr. 380×.

In den anliegenden Konzentrationen traten leichte Ausbuchtungen an den Wurzelhaaren mehr oder weniger häufig auf, in ganz niedrigen und hohen Konzentrationen wurden dagegen fast ausnahmslos normale Härtchen beobachtet. Damit ergab sich als Ursache für das Auftreten verzweigter Wurzelhaare infolge Beimpfung eine weitere Möglichkeit. Die sich im Wurzelbereich

stark vermehrenden Bakterien B 10 u. B 13 könnten in Wurzelnähe eine Konsistenzminderung des Agars — von etwa 1% auf 0,6% — verursacht und damit die Bedingungen hergestellt haben, die für die beobachteten Anomalien verantwortlich sein könnten.

In älteren Arbeiten wurde bereits über ähnliche Beobachtungen berichtet (Zusammenfassung bei KÜSTER). Danach ist die harmonische Gestaltung von Organen und Organteilen sowie die Konstanz der Formen, die nur Raum für eine geringe Variationsbreite läßt, ganz allgemein als die Wirkung von Korrelationen zu betrachten. Demgegenüber muß die Produktion regelloser Formenmannigfaltigkeit, durch die pathologische Zellen und Gewebe ausgezeichnet sind, als Wirkung gestörter Korrelationen angesehen werden. Hierher gehört auch die Formenmannigfaltigkeit der in ihrem Wachstum gestörten Wurzelhaare, Pilzhyphen und Pollenschläuche, für die im Prinzip dieselben Wachstumsgesetze gelten. Normalerweise sind sie zylindrisch und zeigen Spitzenwachstum. Es wachsen die äußersten Teile der halbkugeligen Membrankuppe und die an der Spitze liegenden Membranpartien am intensivsten. Werden die Regulationen, die die Wachstumsintensität in den einzelnen Membrazonen steuern, durch irgendwelche Faktoren gestört, dann resultieren nicht mehr zylindrische Gebilde, wie bei der normalen Ontogenese, sondern die verschiedensten unregelmäßigen Formen. Mit verdünnter Sublimatlösung erhielt man Anomalien an Wurzelhaaren, die in ihrem Aussehen den bei 50%iger Bouillon-Konzentration beobachteten Veränderungen ganz entsprechen (KÜSTER, S. 297). In allen Fällen beruhen die Anomalien auf dem Erlöschen der Tätigkeit normaler Wachstumszentren oder auf der Neubildung von Wachstumsberden.

KÜSTER gibt als Ursache für die hier besprochenen pathologischen Veränderungen Schwankungen der Temperatur, osmotische Einflüsse, Gifte und selbst mechanische Druckeinwirkung an. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß es sich nicht um eine spezifische stoffliche Bakterienwirkung gehandelt hat, weil das Auftreten von Gabelbildungen u. a. Anomalien auch durch verschiedene andere Faktoren verursacht werden kann.

III. Zur Frage organischer Wurzausscheidungen.

Die Frage der aktiven Wurzausscheidung organischer Stoffe hat neben Pflanzenphysiologen auch Mikrobiologen interessiert. Die Literatur zeigt aber, daß sie, soweit sie sich auf die Rhizosphäre bezieht, noch weitgehend ungeklärt ist. Über die bis 1937 erschienenen Arbeiten hat LOEHWING zusammenfassend berichtet. Bezüglich neuerer Ergebnisse sei auf REINBOLDT verwiesen. Man findet unter Wurzausscheidungsstoffen praktisch alle die Stoffe angegeben, die allgemein in lebenden Pflanzenzellen anzutreffen sind: z. B. organische Säuren, Pyridin-Derivate, Aminosäuren, Nucleotide, Alkaloide, verschiedene Zucker, eine Anzahl von Enzymen u. a. mehr. Meist ist aus den Angaben nicht klar zu ersehen, wie die Abscheidungsprodukte gewonnen wurden. Von größter Wichtigkeit für eine kritische Beurteilung der Verhältnisse scheinen uns jedoch folgende Feststellungen zu sein: 1. Nach RUSSEL ist mit einer Sekretion von toxischen Substanzen in gut durchlüfteten Böden nicht zu rechnen. 2. STOKLASA konnte eine Ausscheidung organischer Säuren nur unter O₂-Mangel beobachten. 3. STENLID hat 1947 unter nichtphysiologischen Bedingungen — Hemmung des Sproßwachstums, Unterdrückung der Atmung u. a. — für einige untersuchte organische Stoffe eine starke Ausscheidung nachweisen können.

Ob unter normalen Wachstumsbedingungen diese Stoffe durch Sekretion in das umgebende Medium überreten, ist damit zumindest sehr fraglich.

Es sind in erster Linie methodische Schwierigkeiten, die der Klärung der aktiven Stoffabscheidung lebender Wurzelzellen entgegenstehen. Untersuchungen am natürlichen Standort sind aus einleuchtenden Gründen nicht durchführbar. Auch wird es schwer zu entscheiden sein, ob die abgefaßten Stoffe wirklich durch aktive Sekretion oder durch Autolyse abgestorbener Wurzelzellen freigeworden sind. Soll der Einfluß von Mikroorganismen ausgeschaltet werden, vergrößern sich die methodischen Schwierigkeiten wegen der Notwendigkeit einer sterilen Aufzucht der Pflanzen noch erheblich. Es erscheint unter diesen Gesichtspunkten zweifelhaft, ob überhaupt mit den zur Zeit gegebenen Methoden die Verhältnisse, die für Pflanzen unter natürlichen Bedingungen gelten, eindeutig zu klären sind.

Daß die beobachtete Organismen-Anreicherung in der Rhizosphäre, die ohne Abbau und Zerstörung der Wurzeln erfolgt, eine ständige Versorgung der Mikroorganismen mit organischen Stoffen voraussetzt, wurde schon erwähnt (S. 17). Absterbende, abgelöste Wurzelteile — z. B. Cortical- und Calyptrazellen oder tote Wurzelhaare — werden entscheidend daran beteiligt sein. Andererseits spricht die in den eigenen Untersuchungen beobachtete lokale Anreicherung um junge, noch in der Entwicklung befindliche Wurzelhaare, die STARKEY (2) sowie LINFORD auch bei Pflanzen unter natürlichen Verhältnissen beobachten konnten, für eine Sekretion organischer Stoffe.

Von WEST u. LOCHHEAD wurde die Ausscheidung von Aneurin, Biotin und Aminosäuren als Ursache des „Rhizosphäreneffekts“¹ angegeben. Daß derartige Stoffe auf die Mikroflora einen Einfluß ausüben können, ist verständlich, unabhängig davon, ob sie tatsächlich aus lebenden Zellen ausgeschieden oder aus abgestorbenen Wurzelzellen frei werden. Sie bewirken als Wachstumsfaktoren eine Stimulierung der in dieser Beziehung heterotrophen Organismen, können jedoch nicht allein die an jüngsten Wurzelhaaren zu beobachtende Vermehrung der Mikroorganismen erklären.

Prüfung der Umgebung steril kultivierter Pflanzen auf Aneurin-Ausscheidung (mit Hilfe des *Phycomyces*-Testes) und auf Sekretion von Aminosäuren (mittels der Ninhydrin-Reaktion) verlief bei eigenen Versuchen völlig negativ. Demgegenüber ließ sich nachweisen, daß aus der Rhizosphäre von Mais isolierte Bakterienstämme von der Versorgung mit Aneurin weitgehend unabhängig waren und zum Teil beträchtliche Mengen von Aneurin synthetisierten. Da nun eine Wachstumsförderung

¹ Unter dem „Rhizosphäreneffekt“ wird nach KATZNELSON der Rhizosphären-Boden-Quotient verstanden, d. h. die Anzahl der Mikroorganismen in der Rhizosphäre dividiert durch die Anzahl der in einiger Entfernung von der Wurzel beobachteten Mikroorganismen.

der Pflanzen durch Aneurin verschiedentlich nachgewiesen worden ist und die günstige Wirkung des Stallmistes nach ADDICOTT zum Teil auf den hohen Gehalt an Vitamin B₁ zurückgeführt wird, ist eher mit einer Aneurin-Wirkung auf die Pflanze zu rechnen als umgekehrt. Bekannt ist, daß Bodenmikroorganismen auch andere wachstumsfördernde Substanzen bilden können (BROWN, THOMPSON u. a.). So sollen nach BROWN für das Auskeimen bestimmter Samen wachstumsfördernde Stoffe, die von Mikroorganismen gebildet werden, von Bedeutung sein.

Beim Auskeimen äußerlich steriler Samen in PETRI-Schalen habe ich häufig die Beobachtung gemacht, daß Wurzelspitzen, die das Glas berührten, durch eine Schleimschicht mit der Wandung verklebten, obwohl die mikroskopische Beobachtung absolute Sterilität erwies, und damit Schleimbildung durch Bakterien ausscheiden mußte. Die gleiche Beobachtung konnte ich bei den unter sterilen Bedingungen kultivierten Maispflanzen machen, bei denen die Wurzeloberfläche insgesamt ein wenig verschleimt war.

Daß Blattepidermen, Samen und andere Pflanzenteile Schleimstoffe absondern, ist eine bekannte Erscheinung. Über die Schleimstoffabsonderung bei Wurzeln finden sich nur wenige Angaben. MOLISCH machte die Beobachtung, daß sich Calyptorzellen unter Verschleimung ihrer Wände voneinander trennen und nach Ablösung von der Pflanze alsbald zugrunde gehen. HABERLANDT sowie SABININ haben eine Verschleimung der äußersten Wandschicht der Wurzelhaare feststellen können.

Es lag somit nahe, die Anreicherung um junge, nichtabgestorbene Wurzelhaare mit der Verschleimung der Membranen in Zusammenhang zu bringen. Die Wahrscheinlichkeit dieser Annahme konnte durch folgenden Versuch gestützt werden: Von 30 steril aufgezogenen Maispflanzen wurde die schleimige Hülle der Wurzeln — soweit möglich — abgestreift und die durch die wasserunlöslichen Schleimstoffe getrübte Lösung zentrifugiert. Die abgesetzten Stoffe dienten zusammen mit ausgfaultem, also praktisch nährstofffreiem Agar der Herstellung eines Nährbodens, der für die untersuchten Stämme Wachstum ermöglichte.

Da infolge der festen Verklebung der Schleimstoffe mit den Membranen nur geringe Mengen Schleim zu gewinnen waren, zum andern ein Mitreißen einzelner Rindenzellen nicht vermieden werden konnte, kann nicht klar entschieden werden, inwieweit das Wachstum durch den Schleim oder durch das Zellmaterial bedingt war.

Es mag noch darauf hingewiesen werden, daß man mit der Annahme einer Schleimstoffwirkung die beobachtete begrenzte Lokalisierung der Bakterien um lebende Wurzelhaare besser erklären kann als mit der Vorstellung der Sekretion irgendwelcher wasserlöslicher und damit diffundierbarer organischer Substanzen.

Daß im Boden in erster Linie abgestorbene Pflanzenteile für die Vermehrung von Mikroorganismen in der Rhizosphäre — in quantitativer und qualitativer Hinsicht — Bedeutung haben, muß noch einmal betont werden. Es ist auch daran zu denken, daß die Rhizosphärenflora durch

die lokale Veränderung der Bodenumgebung einer wachsenden Wurzel — z. B. durch pH, CO₂-Konzentration, Durchlüftungs- und Feuchtigkeitsverhältnisse — beeinflußt wird.

IV. Die antagonistische Beeinflussung von *Bacterium radicieola* und ihre Wirkung auf die Knöllchenbildung bei Leguminosen.

Über eine mögliche Schädigung der Leguminosen durch die Tätigkeit von Antagonisten gegen Knöllchenbakterien ist nichts Sichereres bekannt (WAKSMAN). Es sind lediglich in antibiotischen Testversuchen mit einigen Bodenorganismen hemmende oder stimulierende Wirkungen auf Knöllchenbakterien beobachtet worden [KONISHI, KRASSILNIKOW (2), NAUNDORF u. NILSSON]. Der Einfluß von verschiedenen antibiotisch wirksamen Stoffen auf Knöllchenbakterien wurde von SARLES untersucht.

Die Frage, ob unter natürlichen Verhältnissen oder bestimmten Kulturbedingungen die Antagonisten gleichfalls gegen *Bact. radicicola* aktiv sind (oder nicht), sollte in den folgenden Versuchen geklärt werden.

Die erste Aufgabe war somit die Isolierung eines wirksamen Antagonisten. Um die Durchführung von Vitaltesten zu ermöglichen, mußte ein Nährboden zusammengestellt werden, auf dem sich sowohl Knöllchenbakterien als auch andere Bodenmikroorganismen gleichgut entwickeln konnten. (Die zur Kultur von *B. rad.* empfohlenen Nährböden bieten vielen Organismen nur ungenügende Wachstumsmöglichkeiten, während die üblichen Standardnährböden, wie Bouillon und Würze, für die Kultur von Knöllchenbakterien ungeeignet sind.) Als Universal-Nährboden bewährte sich N. B. II¹.

Um antagonistisch wirksame Organismen zu ermitteln, wurden 24 Bakterien und 5 Pilze aus der Rhizosphäre von Erbsen isoliert und auf ihr antagonistisches Verhalten gegen *B. rad.* getestet. Dabei erwies sich nicht einer der 29 Stämme als ausgesprochener Antagonist; es traten nur vereinzelt diffuse Hemmzonen auf (bis zu 2 mm). Aus diesem Grunde wurden weitere Organismen getestet, bis in *Penicillium expansum* ein sehr wirksamer Antagonist gefunden wurde (Abb. 10). Daß die Größe der Hemmzone durch die Einsaatmenge der Knöllchenbakterien weitgehend beeinflußt werden kann (vgl. im übrigen WALLHÄUSSER), geht aus Abb. 11 hervor. Mit *Pen. expansum* konnten nun die geplanten Untersuchungen — der Einfluß des Antagonisten auf die Knöllchenbildung — in Angriff genommen werden.

Damit sich in den teilweise benutzten Sandkulturen auch der Antagonist gut entwickeln konnte, war der Zusatz von organischen Stoffen zu der mineralischen Nährlösung erforderlich. Auf folgendem Substrat waren für den Antagonisten gute Ernährungsbedingungen gegeben, während die Beimpfung mit *B. rad.* allein zu

¹ Zusammensetzung wie auf S. 17, Anmerkung 2, angegeben, jedoch mit einem Zusatz von 100 cm³ Hefeautolysat, 20 cm³ Würze und 10 cm³ Bouillon.

guter Knöllchenbildung führte: Hiltnersche Nlsg.¹ + 0,1% AZ-Lösung nach HOAGLAND + 0,002% Na₂MoO₄ + 100 γ Vit. B₁/Liter + 0,1% Saccharose + 10% Hefeautolysat.

Es konnte gezeigt werden, daß unter den angegebenen Ernährungsverhältnissen im Plattentest die Entwicklung von *B. rad.* durch *P. expansum* gehemmt wurde, die Ernährungsbedingungen also für die Entfaltung antagonistischer Fähigkeiten günstig waren. Es wurden nun 18 verschiedene Versuchsserien mit jeweils 6 Pflanzen (3 Pflanzen/Topf) angesetzt. Das Versuchsergebnis ist in der Tab. 6 zusammengestellt.



Abb. 10.



Abb. 11.

Abb. 10. *Penicillium expansum* gegen *Bacterium radicicola* im Vitaltest auf N.B. II. Der Pilz wurde 2 Tage vorkultiviert, die Platte anschließend durch Besprühen mit einer Aufschwemmung von *Bacterium radicicola* beimpft.

Abb. 11. Wie Abb. 10. Linke Hälfte schwach, rechte stark beimpft.

Die „sterilen“ Kulturen wurden zwar steril angesetzt, aber nach der Keimung der Erbsen und dem Erscheinen des Sprosses unter nicht sterilen Bedingungen gehalten. (Die Kultur erfolgte — aus jahreszeitlichen Gründen — bei künstlicher Belichtung, täglich 16 Std im Licht und 8 Std im Dunkeln. Nach LOEHWING ist es für die Knöllchenbildung vorteilhaft, wenn das C/N-Verhältnis nicht zu weit ist. Die unter photosynthetisch günstigen Bedingungen auftretende Vergrößerung des Kohlenstoff-Gehalts führt zu einer Erweiterung des C/N-Verhältnisses, das sich auf die Knöllchenbildung ungünstig auswirken soll. Deshalb war die Benutzung von elektrischem Licht in unseren Versuchen nicht nachteilig.)

Die Pflanzen der Serien A und B wurden mit sterilem, die unter C und D mit nichtsterilem Regenwasser versorgt. Die Temperatur während des Versuches war 20—22°C. Beimpft wurde in der Weise, daß jeweils für einen Topf die gesamte Bakterienmasse bzw. das gesamte Sporenmaterial 5—8 Tage alter Schrägröhren-Kulturen verwendet wurde. Der Versuch wurde nach 7 Wochen, zu Beginn der Blütenbildung, beendet. In Tab. 6, Spalte 2, ist die Art der Versuchsanstellung zu ersehen. Es wurde mit folgenden Kombinationen gearbeitet: 1. Dem Antagonisten wurde ein Vorsprung von 14 Tagen gegeben, *Bact. rad.* erst nach Ablauf dieser Zeit eingezimpft. — 2. Antagonist und *Bact. rad.* wurden zu gleicher Zeit eingeimpft, nach

¹ 1000 cm³ Aqua dest.: 0,25 g KCl; 0,25 g Ca₃(PO₄)₂; 0,25 g CaSO₄ · 2 H₂O; 0,4 g MgSO₄; 3 Tr. 5% FeCl₃-Lösung. pH = 6,5. Als „Startstickstoff“ wurde 0,0025% Ca(NO₃)₂ zugegeben.

14 Tagen der Same eingebracht. — 3. Der Same wurde beim Einbringen gleichzeitig mit *Bact. rad.* beimpft, der Antagonist erst nach 14 Tagen zugesetzt. — 4. wurden in jeder Serie sowohl allein mit *Bact. rad.* beimpfte als auch nichtbeimpfte Kontrollen gehalten. — In Spalte 2 ist jeweils auf einer Zeile abgekürzt vermerkt, was zeitlich zusammen durchgeführt wurde. Für die Versuche unter A und B wurden äußerlich sterile Erbsen benutzt.

Tabelle 6. Antibiotische Wirkung von *Penicillium expansum* auf *Bacterium radicicola* unter verschiedenen Verhältnissen.

Nr.	Art des Versuchs	zu er- warten	Ergeb- nis	Bemerkungen	
				3	4
A. „Sterile“ Sandkulturen.					
1	unbeimpft.	—	—		
2	<i>Pen. exp.</i> bei Erscheinen des Sprosses <i>Bact. rad.</i> nach 14 Tagen	—	—	Bei 1 Pflanze einzelne Knöllchen	
3	<i>Pen. exp.</i> u. <i>Bact. rad.</i> . Same nach 14 Tagen	—	—	1 Pfl. mit 3 Knöllchen	
4	Same und <i>Bact. rad.</i> . <i>Pen. exp.</i> nach 14 Tagen.	+	±	nur vereinzelt Knöllchen	
5	<i>Bact. rad.</i> allein	+	+	Knöllchen	
B. Kulturen in „steriler“ Gartenerde.					
6	wie 1	—	—		
7	wie 2	—	—		
8	wie 3	—	—	1 Pfl. mit 5 Kn.	
9	wie 4	+	—		
10	wie 5	+	+		
C. Nichtsterile Kulturen in Sand.					
Mit starker Erdaufschwemmung beimpft!					
11	unbeimpft.	+	+		
12	<i>Pen. exp.</i> u. <i>Bact. rad.</i> . Same nach 14 Tagen	—	±	allgemein schwache	
13	Same und <i>Bact. rad.</i> . <i>Pen. exp.</i> nach 14 Tagen.	+	+	Kn.-Bildung	
14	<i>Bact. rad.</i> allein	+	+		
D. Nichtsterile Kulturen in Gartenerde.					
15	unbeimpft.	+	+		
16	<i>Pen. exp.</i> u. <i>Bact. rad.</i> . Same nach 14 Tagen	—	+		
17	Same und <i>Pen. exp.</i> . <i>Bact. rad.</i> nach 14 Tagen	—	+		
18	<i>Bact. rad.</i> allein	+	+		

Es bedeutet: — fehlende Knöllchenbildung;
+ gute Knöllchenbildung;
± schwache Knöllchenbildung.

Setzen wir voraus, daß ein antagonistischer Einfluß von *Pen. expansum* auf *Bact. rad.* in den Versuchskombinationen 1 und 2 vorliegt, dann müßte ein Fehlen oder Auftreten von Knöllchen nach den Angaben der Spalte 3 in Tab. 6 erwartet werden. Wie die Versuchsergebnisse in Spalte 4 zeigen, trifft das für die „sterilen“ Kulturen in Sand und Gartenerde weitgehend zu. Es ist darüber hinaus selbst bei einem Vorsprung von *Bact. rad.* und nachfolgender Beimpfung mit dem Antagonisten eine Beeinträchtigung der Knöllchenbildung zu beobachten; so sind in diesem Falle in Sand (Versuch Nr. 4) nur vereinzelt Knöllchen aufgetreten, in „steriler“ Gartenerde überhaupt keine Knöllchen gebildet worden (Versuch Nr. 9).

Bei den nichtsteril angesetzten Kulturen in Sand und Gartenerde liegen die Verhältnisse anders: Bei einem Vorsprung von *Bact. rad.* und anschließender Beimpfung mit dem Antagonisten kommt es in jedem Falle zu normaler Knöllchenbildung. Wird der Antagonist vorher oder mit *Bact. rad.* zusammen vor der Entwicklung des Wurzelsystems eingepfpt, macht sich ein Einfluß nur insofern bemerkbar, als die Knöllchenbildung allgemein schwächer ist. Es kann aber eindeutig die Tendenz zum Verschwinden der antagonistischen Wirkung beobachtet werden.

Da unter natürlichen Verhältnissen mit einer derart starken Entwicklung eines bestimmten Organismus — wie sie durch Beimpfung mit dem Antagonisten erreicht wurde — kaum zu rechnen ist, wird um so weniger eine antagonistische Beeinflussung von *Bact. rad.* und eine damit zusammenhängende Beeinträchtigung der Knöllchenbildung und N₂-Bindung erwartet werden dürfen.

Daß die antagonistischen Beziehungen in den anfänglich sterilen Kulturen ausgeprägter waren als in denen unter nichtsterilen Bedingungen, hängt zweifellos mit der allgemein gemachten Beobachtung einer begünstigten Entwicklung von Mikroorganismen in sterilisierten Böden zusammen. Bei den „sterilen“ Kulturen in Gartenerde konnte in den ersten Wochen eine überaus starke Entwicklung des antagonistischen Pilzes beobachtet werden, die an der Oberfläche des Bodens stellenweise zu sichtbarer Verpilzung führte. Unter diesen Bedingungen müssen Hemmstoffmengen aufgetreten sein, die eine Entwicklung der Knöllchenbakterien verhinderten. Daß dennoch einzelne Pflanzen Knöllchenbildung gezeigt haben — siehe Versuche Nr. 2, 3 und 8 —, auch wenn diese nicht zu erwarten war, kann man sich so erklären, daß in einzelnen Mikrozonen des Bodens die Pilzentwicklung weniger stark gewesen ist und somit für die dort befindlichen Knöllchenbakterien die Möglichkeit zur Infektion der Wurzeln gegeben war.

Zum Studium der antagonistischen Verhältnisse bodenbewohnender Mikroorganismen wurde das Beispiel der Beeinflussung von Knöllchenbakterien für besonders geeignet gehalten, weil man in dem Auftreten

oder Ausbleiben der Knöllchen gleichzeitig einen Indicator für die Beurteilung des antagonistischen Einflusses in der Hand hatte.

Von seiten der Phytopathologie sind mehrfach Versuche unternommen worden, um durch Impfung des Bodens mit ausgewählten Antagonisten eine biologische Krankheitsbekämpfung zu erreichen. Die Verhältnisse liegen hier ähnlich wie bei den eigenen Untersuchungen mit Knöllchenbakterien: Eine antagonistische Beeinflussung des pathogenen Organismus wird durch das Fehlen der sonst auftretenden Krankheitssymptome angezeigt.

Nach LOCHHEAD u. LANDERKIN haben Versuche dieser Art in natürlichen Böden allgemein enttäuscht. Man kann die Ergebnisse von Laboratoriumsversuchen in dieser Hinsicht einfach nicht auf die Verhältnisse im Boden übertragen. WINTER (2) hat darauf hingewiesen, daß Nahrungskonkurrenz, gegenseitige Beeinflussung der Mikroben durch Bildung oder Zerstörung von Antibiotics und Wirkstoffen, pH- und R_H-Änderungen sowie andere Faktoren in sterilen Böden ausgeschaltet sind und damit Rückschlüsse auf die natürlichen Verhältnisse nicht gestatten. Das beweisen auch die von anderer Seite in derselben Richtung durchgeführten Versuche. So konnte LOCHHEAD durch Bodenimpfung mit 11 gegen *Streptomyces scabies* aktiven Actinomyceten-Stämmen das Auftreten des Kartoffelschorfes nicht verhindern. Demgegenüber will KISSLING den Kartoffelschorf mit Antagonisten im Ackerboden erfolgreich bekämpft haben. Versuche von BROADFOOT mit anderen pflanzenpathogenen Organismen verliefen ebenfalls negativ.

Mit der Einimpfung von Antagonisten zur Bekämpfung von Krankheitserregern wird es nach den bisherigen Erfahrungen allein nicht getan sein.

Wenn es sich bei den Knöllchenbakterien auch um „nützliche“ Parasiten handelt, so kann dennoch in diesem Zusammenhange festgestellt werden, daß die *in vitro* ermittelten antagonistischen Beziehungen zu pflanzenpathogenen Organismen für natürliche Verhältnisse keine Gültigkeit besitzen.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Es wird eine für die Sterilisation von Samen und Früchten entwickelte Methode beschrieben, mit der bei Verwendung von Bromwasser absolute Oberflächensterilität ohne Beeinträchtigung der Keimfähigkeit erreicht werden konnte. Auch quartäre Ammoniumverbindungen erwiesen sich als geeignet. Bei näherer Untersuchung der Sterilität des Samennerns erwies sich das verwendete Material (Erbsen und Mais) im Innern zu 30—40% mit Bakterien infiziert, unabhängig von der Art der Versuchsanstellung. Für die Isolierung der Organismen spielte die Zusammensetzung des Nährbodens eine untergeordnete Rolle. Die Bakterien waren fast ausschließlich zwischen Samenschale und Kotyledonen lokalisiert, die Entwicklung ging nur von wenigen Keimen aus (bis zu 10). *Bacterium radicicola* konnte aus dem Innern von Erbsen nicht isoliert werden. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Samen und Früchten waren äußerlich sterile parenchymatische Wurzel- und Sproßgewebe junger Mais- und Erbsenkeimlinge auch im Innern absolut steril.

Isoliert wachsende Wurzeln — in sogenannten Organkulturen — sind für die Klärung der Beziehungen zwischen Mikroorganismen und Pflanzenwurzeln wenig geeignet. Es konnte bestätigt werden, daß sie

nach Beimpfung sehr bald ihr Wachstum einstellen und Zusätze von Bakt.-Filtrat — in Abhängigkeit von der Konzentration — mehr oder weniger wachstumshemmend wirken. Daß die beobachtete Entwicklungsschädigung nicht allgemein — wie das von anderer Seite angenommen wird — auf einer Wirkung von Heterauxin beruht, konnte chemisch nachgewiesen werden. Bei Trennung der Wurzel in einen oberen, mit organischen Nährstoffen und einen unteren, nur mit Mineralsalzen versorgten Teil war eine Beimpfung ohne Beeinträchtigung des Wurzelwachstums möglich. Die Methode bot jedoch wenig Vorteile, so daß die weiteren Versuche mit steril aufgezogenen ganzen Pflanzen durchgeführt wurden. Mittels einer besonderen Methodik konnte bei direkter Beobachtung bestimmter Mikroorganismen im Wurzelbereich einer bei Nichtbeimpfung steril aufwachsenden Pflanze festgestellt werden, daß sich — unter den gegebenen Versuchsbedingungen — die Organismen mit geringen Ernährungsansprüchen am stärksten anreicherten.

Bei Beimpfung mit einigen Organismen traten Wurzelhaaranomalien, insbesondere Gabelbildungen, auf, deren Ursache weitgehend geklärt werden konnte.

Die von WEST und LOCHHEAD als Ursache für die Mikroorganismen-anreicherung angegebene Aneurin- und Aminosäuren-Ausscheidung konnte nicht bestätigt werden. Andererseits setzt die selbst an jüngsten Wurzelhärrchen beobachtete lokale Vermehrung eine Sekretion organischer Stoffe voraus. Die Anreicherung im Bereich der Wurzeln kann also nicht allein auf dem Abbau absterbender Wurzelzellen beruhen. Eine aktive Sekretion zahlreicher, in der Literatur angegebener Wurzel-ausscheidungsprodukte wird aus verschiedenen Gründen für unwahrscheinlich gehalten. Eigene Untersuchungen sprechen dafür, daß Schleimstoffe, die durch Verquellung der Membranen junger Wurzelteile gebildet werden, für die Vermehrung der Organismen eine Rolle spielen.

Die Knölchenbildung bei Leguminosen kann unter bestimmten Bedingungen durch antibiotische Beeinflussung der Bakterien beeinträchtigt oder verhindert werden. Unter natürlichen Verhältnissen bleibt jedoch der antibiotische Einfluß aus.

Literatur.

ADDICOTT, F. T.: Bot. Gaz. **100**, 826 (1939). — ASH, C. G., and O. N. ALLEN: Soil Sci. Soc. Amer. Proc. **13** (1948). — BERGEY, D. H.: Manual of Determinative Bacteriology. 5th Edition. London, Bailliere Tindall and Cox 1939. — BROADFOOT, W. C.: Can. J. Research **8**, 483, 545 (1948); zit. bei WAKSMAN. — BROWN, R.: Nature **157**, 64 (1946); zit. bei CLARK. — BURCIK, E.: Arch. f. Mikrobiol. **14**, 309 (1949). — BURLET, E.: Ber. schw. bot. Ges. **50**, 519 (1940). — CHANG, H. T., and W. E. LOOMIS: Plant Physiology **20**, 221 (1945). — CLARK, FRANCIS E.: Adv. Agronomy **1**, 241 (1949). — DOLD, H.: Zbl. Bakter. I Orig. **154**, 34 (1949). — FIEDLER, H.: Z. Bot. **30**, 385 (1936/37). — FRED, E., I. BALDWIN, and E. MCCOY: Root nodule bacteria and leguminous plants. Madison 1932. — GEIGER-HUBER, M., u. E. BURLET:

Jb. Bot. **84**, 233 (1936). — HABERLANDT, G.: Physiologische Pflanzenanatomie. Leipzig 1909. — HILTNER, L.: Arb. deutsch. landw. Ges. **98**, 59 (1904). — McILVAINE: J. of Biol. Chem. **49**, 183 (1921). — ISAKOWA, A. A., u. A. SMIRNOWA: C. r. (Doklady) Acad. Sci. USSR **14**, 397 (1937); ref. Bot. Zbl. **30**, 41, 342 (1937/38). — JANKE, A.: (1) Zbl. Bakt. II, **100**, 409 (1939). — (2) Arbeitsmethoden der Mikrobiologie, Bd. I., Dresden und Leipzig 1946. — KANDLER, O.: Arch. f. Mikrobiol. **15**, 430 (1951). — KATZNELSON, H.: Soil Sci. **62**, 343 (1946). — KIESSLING, L. E.: Kühn Arch. **38**, 184 (1939); ref. Zbl. Bakt. II, **90**, 464 (1934). — KLEIN, G., u. J. KISSER: Die sterile Kultur der höheren Pflanzen. Jena 1924. — KONISHI, K.: J. Sci. Soil Man. Japan **9**, 75 (1935); zit. bei WAKSMAN. — KRASSILNIKOW, N. A., u. N. R. GARKINA: Microbiology (USSR) **8**, 958 (1939). — KRASSILNIKOW, N. A., u. A. I. KORENIAKO: Microbiologia (USSR) **13**, 39 (1945); zit. bei WAKSMAN. — KÜSTER, E.: Pathologische Pflanzenanatomie. Jena 1925. — LOCHHEAD, A. G., and G. B. LANDERKIN: Plant and Soil **1**, 271 (1949). — LOEHWING, W. F.: Bot. Review **4**, 195 (1937). — LINFORD, M. B.: Soil Sci. **53**, 93 (1942). — MARCUS, O.: Arch. f. Mikrobiol. **13**, 1 (1942). — MITCHELL, J. W., u. B. C. BRUNSTETTER: Bot. Gaz. **100**, 802 (1938). — MOLISCH, H.: Die Lebensdauer der Pflanze. Jena 1929. — NAUNDORF, G., u. R. NILSSON: Naturwiss. **30**, 753 (1942); **31**, 346 (1943). — NIETHAMMER, A.: Arch. f. Mikrobiol. **12**, 314 (1941); dort weitere Literatur. — PAECH, K.: Fortschr. d. Bot. **12**, 287 (1949). — REINBOLDT, B.: Arch. f. Mikrobiol. **16**, 177 (1951). — RIPPEL-BALDES, A.: (1) Arch. f. Mikrobiol. **14**, 332 (1949). — (2) Naturwiss. **34**, 159 (1947). — RUGE, U.: Übungen zur Wachstums- und Entwicklungsphysiologie der Pflanze. Berlin 1947. — RUSSEL, E.: Soil conditions and plant growth. London 1932. — SABININ, D.: Tageb. d. 1. Kongr. d. russ. Bot. 1921, 35, zit. von KOSTYTSCHEW, S.: Lehrbuch der Pflanzenphysiologie Bd. I, S. 279. Berlin 1926. — SANFORD, G. B.: Sci. Agronomy **28**, 21 (1948); zit. bei CLARK. — SARLES, B.: J. Bacter. **45**, 29 (1943). — SCHANDERL, H.: Botanische Bakteriologie und Stickstoffhaushalt der Pflanzen auf neuer Grundlage. Stuttgart 1947. — SCHOPFER, W. H., M. BEIN u. R. SIGNER: Experientia III, 291 (1947). — SCHWABE, G.: Planta (Berl.) **16**, 397 (1932); zit. bei PAECH. — STARKEY, R. L.: (1) Soil Sci. **45**, 207 (1938). — (2) Soil Sci. **32**, 367 (1931). — STENLID, G.: Sv. Lantbruks högskolans Ann. **14**, 301 (1947); zit. bei HUBER, B.: Fortschr. d. Bot. **12**, 185 (1949). — STILLE, B.: (1) Arch. f. Mikrobiol. **9**, 477 (1938). — (2) Arch. f. Mikrobiol. **15**, 149 (1950). — STOKLASA, J., u. A. ERNEST: Jb. Bot. **46**, 55 (1908). — TERVET, I. W., and J. P. HOLLIS: Phytopathology **38**, 25 (1948). — THOMPSON, R. C.: Univ. Texas Public. **1942**, 4237; zit. bei CLARK. — WAKSMAN, S. A.: Microbial antagonisms and antibiotic substances. New York 1947. — WALLACE, R. H., and A. G. LOCHHEAD: Soil Sci. **67**, 63 (1949). — WALLHÄUSSER, K. H.: Archiv f. Mikrobiol. **16**, 201 (1951) und **16**, 237 (1951). — WEST, P. M., and A. G. LOCHHEAD: Can. J. Research (C) **18**, 129 (1940). — WHITE, PH. R.: Plant Physiology **14**, 527 (1939). — WINTER, A. G., u. R. v. RÜMKER: Arch. f. Mikrobiol. **15**, 72 (1950). — WINTER, A. G.: Arch. f. Mikrobiol. **15**, 42 (1950); **16**, 136 (1951).

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.

Zur Frage der Anpassungsfähigkeit von *Azotobacter*.

Kritische Bemerkungen zu den von N. MALTSCHEWSKY
mitgeteilten Ergebnissen.

Von
H. STOLP und E. SPEYER.

(Eingegangen am 23. Oktober 1951.)

Seit dem Jahre 1948 sind von N. MALTSCHEWSKY verschiedene Arbeiten veröffentlicht worden, die sich mit der Frage der morphologischen und physiologischen Veränderlichkeit von *Azotobacter chroococcum* beschäftigten (1948, 1949a, 1949b). Durch eine kürzlich erfolgte Mitteilung in den „Naturwissenschaften“ (1951) sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen weiten Kreisen bekannt gemacht worden. Wir halten es deshalb für notwendig, das Ergebnis einer von uns durchgeföhrten Nachprüfung zu veröffentlichen.

Das Institut der Autorin stellte uns freundlicherweise Abimpfungen der benutzten *Azotobacter*-Stämme zur Verfügung. Es handelt sich dabei 1. um Az. K. D., Abkürzung für „*Azotobacter*-Karlsruhe-Dissoziiert“¹, in dieser Form zum Stärkeabbau befähigt, — 2. um Az. D. C., Abkürzung für „*Azotobacter*-Dissoziiert-Cellulose abbauend“.

Schon die mikroskopische Überprüfung von Lebend-Präparaten bestärkte uns in dem Verdacht, daß die zu beobachtenden „Dissoziationsformen“ nichts anderes als Verunreinigungen der verwendeten *Azotobacter*-Kulturen darstellten. Es gelang uns, mit den in der Bakteriologie üblichen Methoden die Begleitorganismen zu isolieren und rein zu züchten. Die Gewinnung einer Reinkultur von *Azotobacter* war wegen der starken Schleimbildung und des dadurch begünstigten Mitschleppens von Begleitorganismen besonders schwierig, eine Tatsache, auf die schon von FISCHER (1947) hingewiesen worden ist. Auf eine genaue Identifizierung haben wir bei einigen Arten verzichtet, da es uns in erster Linie auf eine Überprüfung der Kulturen und ihrer Fähigkeiten bezüglich des Stärke- und Celluloseabbaus ankam.

Aus der Kultur „Az. K. D.“ konnten wir neben *Azotobacter* noch *Bact. radiobacter* und 2 stäbchenförmige Bakterien isolieren. In der Cellulose zersetzenen *Azotobacter*-Kultur „Az. D. C.“ wurden eindeutig folgende Organismen als Verunreinigung festgestellt: *Streptomyces* sp., *Sporocytophaga myrococcoides*, *Streptococcus* sp. sowie zwei verschiedene

¹ MALTSCHEWSKY benutzt die von BURRI (1943) gegebene Definition des Begriffs der „Dissoziation“ von Bakterien, „worunter man Eigenschaftsänderungen versteht, die anscheinend Modifikationen darstellen“ (1948, S. 244).

stäbchenförmige Bakterien, von denen eines gelbgrünen Farbstoff bildet. Daneben wurden *Amöben* festgestellt, die weiter in Mischkultur gehalten wurden. Bei der von MALTSCHEWSKY angewandten Arbeitsmethodik ist ein solcher Befund nicht überraschend.

Zu den Versuchen hinsichtlich des Stärkeabbaus durch *Azotobacter* ist folgendes zu sagen: Die Ansicht MALTSCHEWSKYS, daß es „bis jetzt nicht möglich schien, einige Kohlenhydrate, wie z. B. Stärke, als C-Quelle für *Azotobacter* zu verwenden“ (1948; S. 243) ist durchaus irrig. (Siehe dazu BERGEY!)

Wenn die diastatische Fähigkeit von *Azotobacter* auch relativ schwach ist, so kann der Stärkeabbau doch sehr leicht und eindeutig mit Hilfe der Jod-Reaktion bewachsener Stärke-Agar-Platten nachgewiesen werden. Es sei im übrigen nachdrücklich darauf hingewiesen, daß Bakterienwachstum auf Kartoffelschalen und Trockenkartoffeln (die bei den Versuchen von MALTSCHEWSKY verwendet wurden) nicht unbedingt auf den Abbau der Stärke zurückgeführt werden muß. Dazu ist ein solches Natursubstrat, das neben der Stärke eine Anzahl weiterer Nährstoffe enthält, zu wenig einheitlich. Wenn die Beimpfung mit dem gram-negativen *Azotobacter* nach dessen „Anpassung“ an das Kartoffelschalen-Substrat zur Entwicklung „etwas länglicher, kokkenförmiger Zellen“ (1948; S. 245) führte, und die mikroskopische Beobachtung des Bakterienschleims später „kleine kokkenförmige oder kurze Stäbchen von etwa 1 μ Durchmesser, die gram-positiv waren“ (1948; S. 246) erkennen ließ, dann hätte die Möglichkeit einer Fremdinfektion zumindest in Erwägung gezogen werden müssen.

Statt dessen werden alle irgendwie erreichbaren Beobachtungen, die von anderer Seite bei Untersuchungen mit *Azotobacter* gemacht wurden, oft ohne erkennbaren Zusammenhang zur Stützung der Theorie einer „Dissoziation“ dieses Bakteriums herangezogen.

So wird z. B. wörtlich bemerkt, daß die „distinkten nucleal-positiven Körnchen, die STILLE (1937) bei *Azotobacter* fand, für das Auftreten von Dissoziationsformen von wesentlicher Bedeutung sein könnten“ (1948; S. 247). Daneben werden verschiedene gänzlich unbegründete Ansichten geäußert. So ist z. B. folgendes zu lesen: „Es besteht die Möglichkeit, daß die Kartoffelstärke wegen ihrer Wasserunlöslichkeit in die Zelle der normalen *Azotobacter*-form durch die Membran nicht diffundieren kann; dagegen können vielleicht beim Zerfallen der Bakterien in kleine kokkenförmige Körper, die den Bakterien eigenen Endofermente sich als Ektofermente auf die vorhandenen Kohlenhydrate auswirken und damit die Stärke dem *Azotobacter* zugänglich machen“ (1948; S. 247).

Die von uns aus der Kultur *Az.* K. D. isolierten beiden stäbchenförmigen Bakterien besitzen ausgeprägt diastatische Fähigkeiten, so daß sie sich auf dem Kartoffelschalensubstrat auf Kosten der Stärke gut entwickeln konnten. Wenn sich bei der Rückimpfung vom Kartoffelsubstrat auf Mannit wieder normale *Azotobacter*-Zellen entwickelten, dann dürfte das nicht weiter überraschen, da ein Mannit-Substrat für *Azotobacter* bekanntlich besonders günstig ist. Was also von MALTSCHEWSKY als „reversible Dissoziationsumwandlung“ (!) bezeichnet wird (1948; S. 248), ist praktisch nichts anderes als die elektive Wirkung unterschiedlicher Nährböden auf Mischkulturen.

Die Versuche zur Cellulosezerersetzung durch *Azotobacter* sind methodisch kaum diskutabel. Aus Kartoffel-, Apfel- oder Birnenschalen, sowie auch anderen Materialien, wurden mit Sand Komposte hergestellt und mit dem schon an Stärke — d. h. Kartoffelschalen — „angepaßten“ *Azotobacter* beimpft. Auf diesem Substrat, das schon von Natur aus mit den verschiedensten Mikroorganismen besiedelt war — eine Sterilisation wurde überhaupt nicht vorgenommen! — soll sich dann wieder eine „Dissoziation“ vollzogen haben. Wenn diese mit allen möglichen Organismen besiedelten Kompostkrümel dann in sterilem Wasser aufgeschwemmt und zur Beimpfung sterilisierter Cellulose-Flüssigkeitsnährböden benutzt würden, so kann die Beobachtung der Cellulose-Zersetzung absolut nicht überraschen. Nach der Isolierung der aerob Cellulose zersetzen *Sporocytophaga* war uns die Sachlage völlig klar: Die in der gelben Bakterienmasse der Cellulose-Kulturen beobachteten „kokkenähnlichen Zellen“ (1949a; S. 257) waren nichts anderes als die 1,2—1,6 μ großen Mikrocysten der *Sporocytophaga*. Das für diesen Organismus typische vegetative Stadium in Form eines 6 bis 10 \times 0,2 bis 0,4 μ messenden flexiblen und ungewöhnlich hyalinen Stäbchens scheint der Beobachtung MALTSCHEWSKYS ganz entgangen zu sein. Auch unter Berücksichtigung der bei Bakterien zu beobachtenden morphologischen Variabilität und physiologischen Anpassungsfähigkeit muß eine Entstehung der Cellulose zersetzen Cytophagen aus *Azotobacter*-Zellen abgelehnt werden. Die *Cytophaga*-Gruppe wird wegen ihrer sehr speziellen Eigenschaften nicht einmal zu den *Eubacteria* gerechnet, sondern in der Systematik an die *Myxobacteria* angeschlossen.

Wir konnten eindeutig nachweisen, daß nicht der aus der Kultur *Az.* D. C. isolierte *Azotobacter*-Stamm, sondern allein die *Sporocytophaga* für den Celluloseabbau verantwortlich war.

Bei dem gelben Farbstoff, über den MALTSCHEWSKY rein hypothetische und teilweise fehlerhafte Angaben macht, handelt es sich um das bei den Cytophagen auftretende Pigment. Wenn berichtet wird, daß Kontrollversuche zur Cellulose-Zersetzung mit anderen *Azotobacter*-Stämmen negativ verliefen, dann ist dies nur ein Beweis dafür, daß in diesen Kulturen zumindest keine Cellulose-Zersetzer zugegen waren. Die Beimpfung mit *Az.* K. D. soll „ein kaum sichtbares Wachstum mit schwacher gelber Färbung des Filtrerpapiers, die jedoch nicht zu weiterer Entwicklung kam“, (1949a; S. 258) ergeben haben. Die uns übersandte *Az.* K. D.-Kultur war jedoch frei von Cellulose-Zersettern. Es muß erwähnt werden, daß bereits umfassende Untersuchungen über das Verhalten von Mischkulturen von *Azotobacter* und *Cytophaga* durch BUCKSTEEG (1936) durchgeführt worden sind.

Es liegt nahe anzunehmen, daß die in der Kultur vorhandenen Amöben bzw. deren Cysten nicht übersehen wurden, sondern mit den von MALTSCHEWSKY beschriebenen und abgebildeten „*Azotobacter*-Riesenzytellen“ (1949a; S. 257) identisch sind.

Wenn die Autorin in ihrer zweiten Mitteilung (1949 a; S. 262) schreibt, daß ihre Ergebnisse auf die Möglichkeit hinweisen, mit derartigen Versuchen einen „nützlichen Dienst für die Landwirtschaft, die Industrie oder die Medizin zu leisten“, so können wir uns dieser Meinung durchaus nicht anschließen.

Zusammenfassung.

Die von MALTSCHEWSKY angegebene Umwandlung von *Azotobacter* in morphologisch und physiologisch verschiedenenartige Formen erwies sich als durch fehlerhafte Methodik sowie Verwendung unreiner Kulturen bedingt.

Literatur.

BERGEY: Manual of determinative bacteriology. 6. Auflage. London 1948. — BUCKSTEEG, W.: Zbl. Bakter. II, 95, 1 (1936/37). — BURRI, R.: Ber. Schw. Bot. Ges. 53a, 277 (1943). — FISCHER, W.: Arch. f. Mikrobiol. 14, 353 (1947). — MALTSCHEWSKY, N.: Z. Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde 42, 87, 241 (1948); 43, 88, 254 (1949 a); 47, 92, 249 (1949 b). — Naturwiss. 38, 304 (1951). STILLE, B.: Arch. f. Mikrobiol. 8, 125 (1937).

(From Hopkins Marine Station of Stanford University Pacific Grove, California,
U.S.A.)

The Cultivation of *Myxophyceae*.

By
M. B. ALLEN.

(*Eingegangen am 19. November 1951.*)

The *Myxophyceae*, or *blue-green algae*, are notable for their ability to develop in an extremely wide range of habitats. They are the first organisms to colonize sterile volcanic soils, yet they abound in polluted waters; they develop in masses on the icy deserts of Central Asia and the mountaintops of Japan, and they also develop in masses in the waters of hot springs, at the highest temperatures reported for any living organisms. Many live in association with other organisms, with fungi in lichens, with protozoa in *Cyanophora*, even within the roots of *Cycads* and the rhizomes of *Gunnera*. [For discussions of habitats cf., e. g., GEITLER (1925), MOLISCH (1926), FRITSCH (1945).]

It might be expected that the biochemical and physiological problems posed by a group of organisms capable of such extraordinary versatility would attract many investigators to their study. The number of papers which have been published on such problems attests to the attraction, but the progress which has been made is relatively small. Much of this lack of progress must be traced to the difficulty which has been encountered in obtaining pure cultures of *Myxophyceae*, and the consequent inability to perform well-controlled experiments. However, several workers during the past forty years have been able to grow some of the more common soil and water inhabiting blue-green algae, as well as one endophyte, in pure culture, while in the past few years a relatively large number of cultures has been isolated.

The first claims for pure cultures of *Myxophyceae* were made by TISCHUTKIN in 1897, BOUILHAC in 1898, and BEIJERINCK in 1902. Since none of these authors reported tests of their cultures for contaminants in media favorable for the growth of bacteria, and since later experience has shown that cultures which are apparently pure when grown on mineral media may give rise to an abundant bacterial flora on organic media, it seems possible that these investigators obtained only unialgal cultures free from gross contamination. BOUILHAC's cultures can certainly not have been pure since he isolated them only by successive transfers in liquid mineral media. The first indubitably pure cultures were obtained by PRINGSHEIM in 1913. His method was, however, tedious, and successful in only a small number of cases, so that he was able to isolate only three bacteria-free cultures, two *Oscillatorias* and one *Nostoc*, out of a large number of unialgal cultures. In 1917 HARDER isolated a pure culture of the endophytic *Nostoc punctiforme*, as well as an *Oscillatoria*, an

Anabaena, and a *Cylindrospermum*. He began by using the PRINGSHEIM technique of passage from gypsum blocks to mineral agar, to silica gel, and finally onto agar with organic nutrients, but found that he could obtain better results for his organisms by repeated transfers through agar rather than silica gel, since his algae did not develop well on silica media. DREWES in 1928 also isolated three pure cultures, two *Anabaenas* and one *Nostoc*, by use of the HARDER technique. Both he and HARDER found it advantageous to utilize the phototactic and phototropic behavior of filamentous *Myxophyceae* as an aid in freeing them from bacteria. A similar technique was used by CATALDI (1941) for isolation of a number of *Oscillatorias*.

In more recent years various workers have attempted to circumvent the tediousness of isolations by the PRINGSHEIM and HARDER methods by treatment of unicellular cultures with agents preferentially harmful to bacteria as compared with *Myxophyceae*. ALLISON et al. in 1933 used irradiation with ultra-violet light to obtain a bacteria-free culture of *Nostoc muscorum*; this method has been extensively applied in the past few years by GERLOFF and his collaborators, resulting in the isolation of 10 bacteria-free cultures of various blue-green algae. FOGG in 1942 obtained a pure culture of *Anabaena cylindrica* by washing with chlorine water.

It may be noted that the above survey of cultures isolated makes no mention of unicellular *Myxophyceae*. Until the work of GERLOFF et al. (1950), and of the present investigation, only one unicellular representative was isolated in bacteria-free form. This culture, a remarkably rapidly growing *Chroococcus*, was isolated in 1938 by CLARA GAFFRON at the Hopkins Marine Station. The algae had appeared as a "colony" on the wall of a bottle completely filled with a mineral sulfide medium after the primary flora of purple sulfur bacteria had subsided (see below). Pure cultures were obtained by repeated transfer of single colonies through pour plates prepared with a mineral agar of a composition corresponding to that of the liquid medium except for sulfide.

General observations on methods of obtaining cultures.

The raw material from which cultures of *Myxophyceae* can be isolated is easily obtained. Masses of these algae may often be found in polluted waters, in the soil or on pots in greenhouses, in hot springs, and in streams fed by them, especially if a little sulfide is present to discourage growth of green algae. In California one may often observe a macroscopic development of blue-green algae in the small pools and run-off streams formed by the Spring rains. *Myxophyceae* may also be obtained readily by enrichment culture in the laboratory. A simple and reliable method for development of members of the spore-forming genera *Anabaena*, *Cylindrospermum*, and *Nostoc* from soil is due to BEIJERINCK (1902). It consists of inoculating soil into a relatively large flask, which is then filled about half full with a solution of 0.02% K_2HPO_4 in tap water and allowed to stand in a lighted spot for several weeks. Within this time colonies of these algae, blue-green to greyish-green in color, may be observed to appear on the glass walls of the container.

Another convenient laboratory source of blue-green algae, in this case most commonly *Oscillatorias*, is soil or mud inoculated into mineral media containing low concentrations of sulfide. When enrichment cultures for

purple sulfur bacteria are allowed to stand until the sulfide concentration in the solution falls to a very low level, or when fresh media containing sulfide concentrations of the order of 0.02—0.04% are inoculated with mud, an abundant development of *Myxophyceae* is often observed.

Starting material for cultures of unicellular *Myxophyceae* is a little more difficult to obtain regularly. An abundant development of such algae may sometimes be found in nature, but less often than one of filamentous blue-green algae; moreover, those unicellular members of the group frequently found in caves, on walls, etc. are likely to have thick gelatinous sheaths which make their purification difficult. It has been observed that unicellular *Myxophyceae* frequently appear as a 'terminal flora' when raw cultures containing relatively large masses of other algae are allowed to stand for long periods of time. After the filamentous forms have died out, the unicellular ones come to the fore.

From such raw cultures, transfers of bits of algal material can be made to fresh liquid media, or directly to solid media. Since the growth of many filamentous *Myxophyceae* is greatly improved by the presence of a solid substrate, it is often preferable to proceed to solid media as soon as possible. On the other hand, algae highly contaminated with bacteria are likely to be overgrown on agar, so that several transfers through liquid media may be useful. Washing the algal filaments may be helpful with relatively tough types such as *Nostoc* and *Anabaena*, but the filaments of an *Oscillatoria*, *Phormidium*, or *Lyngbya*, are frequently so damaged by such treatment that no further growth occurs. The results obtained in this investigation substantiate the observations of earlier workers that growth of many blue-green algae, especially in the presence of contaminants, is markedly better when the algae are mixed with an agar medium, rather than spread over its surface.

Various nutrient solutions have been used for isolation and maintenance of cultures by past and present workers, most of the media being variations on a theme devised in the 1890's by A. RICHTER (1892) and by MOLISCH (1896). The essential features of these solutions are: 1) a weakly alkaline reaction, usually obtained by the use of K_2HPO_4 , although sometimes the medium is made more markedly alkaline with sodium silicate or carbonate; 2) the addition of combined nitrogen as calcium or potassium nitrate; and 3) the presence of Mg and Fe ions. The proportions of the different salts vary; experience gained in this investigation has confirmed the conclusion of HARDER (1917) that the growth of most common *Myxophyceae* is little, if any, affected by variations in the concentrations (from 0.01 to 0.1%) or proportions of these salts. A summary of various media which have been used is given in Table 1.

For the culture of nitrogen-fixing species of *Nostoc* and *Anabaena* it has been the practice to omit combined nitrogen from the medium. This has the further advantage of reducing the number of bacteria which can develop.

Table I. Media used for cultivation of *Myxophyceae*.

	RICHTER	MOLISCH	BELIERINCK	PRINGS-HEIM	HARDER	DREWES	ALLISON ¹	EMERSON-Lewis	CHU NO. 10 (GERLOFF)	ALLEN NO. 3	ALLEN NO. 4
Ca(NO ₃) ₂	0.01	0.02		0.1	0.05			0.1	0.004		0.1
KNO ₃				(0.05)							0.1
Na ₂ NO ₃											0.005
NH ₄ NO ₃											0.025
NH ₄ Cl											0.025
K ₂ HPO ₄	0.001	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.05	0.005	0.001	0.005	0.005
KH ₂ PO ₄											
MgSO ₄	0.001	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.1	0.001	0.025
CaSO ₄											
CaCl ₂					0.01						
FeSO ₄					tr.						
FeCl ₃					tr.						
Na ₂ CO ₃											
Na ₂ SiO ₃											
Fe citrate											
Citric acid											
Soil extract											
Na glutamate											
Trace metals											
Tap water	100	100	100	—	100	—	100	100	100	100	100
Distilled water											

¹ Also: NaCl, 0.02 grams, and CaCO₃, 0.1 to 0.5 grams per 100 ml.

The results of various authors differ as to the value of addition of organic materials to the nutrient medium. BEIJERINCK (1902) was unable to obtain good growth of his blue-green algae on agar media unless the agar was carefully washed. His student VAN DELDEN observed *Oscillatoria* strains to be even more sensitive to organic impurities in agar. On the other hand, TISCHUTKIN (1897) reported that agar water itself was an excellent medium for the development of various blue-green algae. PRINGSHEIM (1917) found it desirable to add soil extract to his cultures when they were grown in liquid media; on silica gel or agar there was no effect of soil extract on most cultures. GERLOFF et al. (1950) have grown a number of *Myxophyceae* in what they consider to be a completely mineral medium.

The medium of GERLOFF, however, contains small quantities of citrate. Experience here has shown that it is often desirable to add small quantities of yeast autolysate, glutamate, or citrate to the media used for culture; in a few cases algae have been obtained which do not grow without such additions, neither in liquid nor on solid media. It is usually better to omit if possible the addition of organic material during isolation, since such additions cause an increase in the number of contaminants, but algae which fail to grow on transfer from crude cultures should be tested for their requirements for organic materials. The possible function of such organic additions will be discussed in a later section.

The diverse effects found by different investigators with regard to this and other nutritional matters are probably reflections of the variety existing in the group of *Myxophyceae*. It can scarcely be expected that uniform behavior would be exhibited by a group of organisms whose members are known to cover so extensive a range of ecological habitats.

Cultures used in the present investigation.

Filamentous cultures isolated by the author were obtained by the HARDER-DREWES method of repeated transfer on agar, first, if possible, with only mineral salts added, later with yeast autolysate also added to promote the growth of any bacteria which might be present. Yeast autolysate was selected for this purpose because most bacteria will grow well on it and because it was more favorable to the growth of the majority of the algae encountered than peptone or other common organic nutrients. The general procedure was to inoculate on one side of an agar plate which was then placed so that it was illuminated from the side away from the inoculum. In the case of motile isolates, filaments move toward the light, so that within a few days the first filaments to reach the far side of the agar plate could be removed and re-inoculated onto another plate in the same manner. To avoid damage to the rather delicate filaments of *Oscillatoria* and similar algae, this was accomplished by cutting out a small block of agar containing the filament and placing it on a fresh plate. To ensure freedom of the filaments chosen from visible

contamination, the plates were subjected to careful microscopic examination. With non-motile cultures a similar procedure was employed. In this case the directed growth rarely, if ever, reached the far side of the plate. Filaments, as isolated as possible, were removed from the periphery of the spreading growth. Isolation of cultures by this method often required a large number of transfers before cultures appeared pure even on the mineral agar medium, and still more before rigorously pure cultures were obtained on the medium to which yeast autolysate had been added. Selective poisons were used only in the case of two *Oscillatoria* isolates (E2 and A3) which were passed through sulfide-containing media to inhibit their accompanying bacteria. It appears preferable to the author, whenever possible, that is, when dealing with rapidly growing, motile, or not too slimy *Myxophyceae*, to isolate cultures without the use of possible mutagens such as ultraviolet light. It is recognized, however, that irradiation may be very useful in the winning of pure cultures in difficult cases, such as in the case of non-motile organisms accompanied by considerable slime.

Cultures of unicellular *Myxophyceae* were isolated in a more or less similar manner by repeated pour plates. Streaked plates were found to be of little or no value, since many unicellular blue-green algae do not grow well on the surface of agar plates, while their accompanying bacteria are encouraged by such treatment. It has frequently been of value in the isolation of cultures of unicellular algae to pour rather thick agar plates; then, after growth of the algae, to remove the agar upside down into a larger Petri-dish, and pick fresh inoculum from the relatively less contaminated colonies in the bottom layers of the plate. It is possible that even better results might be obtained by working with deep layers of agar in test tubes. This method has been successful only with unicellular *Myxophyceae* which are not surrounded by abundant slime; good results have been obtained with *Synechococcus*, which has no sheath, and with *Chroococcus* spp. with relatively thin sheaths; but with cultures of *Gloeocapsa* and *Aphanocapsa*, with thick slime layers, it has not as yet been possible to obtain bacteria-free cultures by this type of procedure.

All cultures which have been established as presumptively pure by passage through two plates of mineral agar plus yeast autolysate without any visible development of bacteria or fungi have been checked for purity by inoculation into tubes of liquid media containing (a) 10% yeast autolysate, (b) the same plus 2% glucose, (c) the same with 2% glucose and 2% calcium carbonate. In these media the culture has been incubated for four to eight weeks at 25—30° C to allow any contaminants which might be present a chance to develop. Since few saprophytic bacteria or microscopic fungi will not develop in one or more of these three media, and since microbes such as sulfur bacteria or nitrifying bacteria, which

would not develop, are not likely to be persistent contaminants, cultures which show no contamination by this test have been judged to be pure and included in the collection.

In addition to cultures isolated in this laboratory, a number of bacteria-free cultures have been obtained by exchange with other workers. Three strains which has not as yet been possible to obtain in better than unialgal culture have been included in a few experiments on mineral nutrition. A list of the isolates used, together with their sources, is given in Table 2. The names given are in general those under which the cultures were received. Those isolated here or received unnamed have been determined only as to genus, except for *Synechococcus cedrorum*, which was kindly identified by Prof. E. G. PRINGSHEIM.

Table 2. *Myxophyceae used in this study.*

Alga	Source	Remarks
1. <i>Synechococcus cedrorum</i>	natural culture sent from Woods Hole, Mass., by E. H. BATTLEY	requires addition of organic acids for growth
2. <i>Chroococcus turgidus</i> , var. <i>nigricans</i>	unialgal culture from R. HECKER	purified by M. B. ALLEN
3. <i>Chroococcus</i> sp.	pure culture from A. FRENKEL	
4. <i>Chroococcus</i> sp. (strain B)	Tassajara Hot Springs, Monterey County, Calif.	
5. Unidentified unicellular alga	'Lemonade Spring', The Geysers Sonoma County, Calif.	grows in acid solution see text
6. <i>Aphanocapsa sessilis</i>	J. B. THOMAS, Utrecht	not bacteria-free
7. <i>Gloeocapsa polydermatina</i>	J. B. THOMAS, Utrecht	not bacteria-free
8. <i>Oscillatoria</i> sp. (strain E2)	soil enrichment	
9. <i>Oscillatoria</i> sp. (strain T5)	Tassajara Hot Springs, Monterey County, Calif.	
10. <i>Oscillatoria</i> sp. (strain A3)	Moss Beach, Pacific Grove, Calif.	requires org. materials and highly alkaline medium
11. <i>Oscillatoria princeps</i>	G. C. GERLOFF	not bacteria-free
12. <i>Lyngbya aestuarii</i>	unialgal culture from J. B. THOMAS	purified by M. B. ALLEN
13. <i>Lyngbya</i> sp. (strain 6)	unialgal culture from M. DYAR	purified by M. B. ALLEN
14. <i>Lyngbya</i> sp. (strain 55)	pure culture from M. DYAR	

Table 2 (continued).

Alga	Source	Remarks
15. <i>Phormidium foveolarum</i>	unialgal culture from E. G. PRINGSHEIM	purified by M. B. ALLEN
16. <i>Phormidium luridum</i>	pure culture from E. G. PRINGSHEIM	
17. <i>Phormidium</i> sp. (strain 25)	pure culture from M. DYAR	
18. <i>Phormidium</i> sp. (strain 76)	unialgal culture from M. DYAR	purified by M. B. ALLEN
19. <i>Anabaena cylindrica</i>	pure culture from G. E. FOGG	
20. <i>Anabaena variabilis</i>	pure culture from R. HECKER	
21. <i>Anabaena</i> sp.	unialgal culture from H. W. MILNER	purified by M. B. ALLEN
22. <i>Anabaena</i> sp. (strain 28a)	pure culture from M. DYAR	
23. <i>Nostoc muscorum</i> (ALLISON strain)	received as pure culture from S. H. HUTNER	
24. <i>Nostoc</i> sp.	pure culture from E. G. PRINGSHEIM	Originally from T. GIBSON
25. <i>Nostoc</i> sp. (GIBSON strain 2)	received as pure culture from M. DYAR	
26. <i>Nostoc</i> sp. (GIBSON strain 4)	received as pure culture from M. DYAR	
27. <i>Nostoc</i> sp. (GIBSON strain 30)	received as pure culture from M. DYAR	
28. <i>Plectonema notatum</i>	pure culture from M. DYAR	
29. <i>Calothrix parietina</i>	pure culture from G. C. GERLOFF	
30. Unidentified fila- mentous alga (strain 3)	pure culture from M. DYAR	

One culture in the list (No. 5) requires special mention. Its taxonomic position is uncertain, since it possesses the mode of reproduction (nanocyte formation) characteristic of *Gloeocapsa* or, more rarely, of *Aphanothecce*; yet, since its sheath is very thin or lacking entirely, *Gloeocapsa* appears excluded, and its spherical cell shape would similarly eliminate *Aphanothecce*. Physiologically, it is extremely interesting as providing an example of a blue-green alga which presents a glaring exception to the rule that organisms of this class thrive only in alkaline environments. It will tolerate and grow well in extremely acid solutions (up to 1 N

sulfuric acid); it grows on organic media in the dark at a rate comparable to its rate of growth in the light; and when grown in the dark it loses its chlorophyll and phycocyanin and becomes a light straw yellow in color. It will be referred to as the 'acid alga' in this paper.

Physical conditions for growth.

Although a survey of the older literature, especially the paper of PRINGSHEIM (1913), shows that it has often been more or less implicitly recognized that certain physical conditions must be satisfied if good growth of *Myxophyceae* is to be obtained, these conditions have received little explicit discussion, and recent workers appear to have neglected them entirely. The extremely long times for maximum growth reported by GERLOFF et al. (1950) may well be due to their practice of growing filamentous *Myxophyceae* in thick layers of liquid medium. The filamentous forms cultured here (including GERLOFF's culture of *Calothrix parietina*) usually reach maximum growth within a week to ten days of continuous illumination under favorable conditions such as described below.

When experiments on the nutrition of filamentous *Myxophyceae* were begun in this laboratory, it was noted that when filamentous forms which were regularly cultured on mineral agar were introduced into liquid media their growth was extremely variable. Unless a large inoculum was used, often no growth at all was obtained. Such a result might be due to a need for organic nutrients which were supplied by an agar medium but lacking in a solution. However, in this case it was shown that abundant, reproducible growth could be obtained by growing in relatively thin layers of liquid medium and by introducing into the liquid medium a solid substratum in the form of glass wool. The beneficial effects of a solid substrate on the growth of *Myxophyceae* have been remarked upon by several earlier workers. In the case of the present experiments it appears unlikely that anything more than a physical effect is involved. The wool used was of Pyrex glass and was freed of possible organic contamination by extraction with alcohol and ether. No pH change was observed on letting the medium stand for several days in contact with the glass wool, indicating no dissolution of alkali from the glass. A solution of minor elements is regularly added to the mineral medium, so that it seems unlikely that the favorable role of the glass wool should be ascribed to the possibility that it might provide a leachable source of trace metals.

The effect of a glass wool substratum on the yield of cell material from four strains of filamentous *Myxophyceae* is shown in Table 3. The cultures were incubated 10 days under continuous illumination from a row of 25 w. electric lamps at 25 cm distance. After this period, the algal mass was separated from the nutrient solution by centrifugation, washed with water, and dried in an oven at 110° C. It may be noted that the yields obtained here are the result of growth in relatively low light intensity, of incubation without addition of CO₂ above that normally

Table 3. Effect of glass wool on cell yield.

Dry weight of cell material. Algae in medium 3 in 125 ml ERLENMEYER flasks.

	<i>Phormidium</i> str. 25	<i>Nostoc</i> str. 30.	<i>Oscillatoria</i> str. E2	<i>Anabaena</i> <i>cylindrica</i>
20 ml medium	6,0 mg	1,5 mg	<1 mg	10,4 mg
50 ml medium	3,8	1,5	<1 mg	10,0
20 ml medium + glass wool	11,5	9,5	23,8	28,9

present in air; in general without any attempt at obtaining the maximum possible yield of cell material.

Some unicellular *Myxophyceae* also show a marked dependence on the physical conditions of their environment. As has previously been mentioned, they do not grow well on the surface of agar plates. If a tube of agar medium is uniformly inoculated with such algae, allowed to solidify, and incubated in the light, a dense zone of growth appears a few millimeters below the agar surface, with thin scattered growth below this. No growth occurs on the surface. The picture resembles that obtained with microaerophilic organisms such as *Spirilla*. Since micro-aerophilic behavior of an oxygen-producing organism in the light is scarcely to be expected, another explanation of this phenomenon has been sought. Some indication of the reason for the surface-shunning behavior may be found in the result of an experiment in which tubes of agar medium uniformly inoculated with unicellular blue-green algae were incubated in the light in atmospheres in which the humidity was reduced by the use of concentrated calcium chloride solutions. In this case, especially with *Synechococcus cedrorum*, which shows the phenomenon most strikingly, the zone of dense growth moved downward to a position about a centimeter below the agar surface. The thin growth in the lower parts of the agar is most likely due to a lack of CO₂, which was supplied by the air in these experiments.

The hypothesis that this surface-shunning behavior is due to an inhibiting effect of drying is supported by a consideration of the types of algae which show this behavior. Among the unicellular *Myxophyceae* which have been studied here, the effect is most clearly shown in *Syn. cedrorum*, which has no gelatinous sheath around it, and somewhat less clearly in two *Chroococcus* spp., which have relatively thin mucilaginous sheaths surrounding them. With *Gloeocapsa* and *Aphanocapsa*, which have abundant mucilage, good surface growth can be obtained. A similar situation is found among the filamentous *Myxophyceae*. In *Oscillatoria*, where a sheath is lacking, the filaments tend to burrow into the agar and grow well on the surface only when conditions are so favorable for growth that large masses of the algae accumulate. This phenomenon

may account for the rather mysterious statement of BEIJERINCK (1902) that *Oscillatoria* is microaerophilic in the dark and macroaerophilic in the light. In the dark, where growth is slow at best, the tendency to conserve moisture would cause the algae to avoid an exposed surface, while in the light, where vigorous growth is possible, the accumulation of large algal masses affords protection against drying out and the better carbon dioxide supply obtaining at the surface would cause the algae to concentrate there. With *Phormidium*, or *Lyngbya*, where a thin sheath is present, the burrowing tendency still exists, but is less marked, while with definitely mucilaginous *Nostoc* and *Anabaena* cultures good surface growth is obtained and the tendency to burrow is absent.

This apparent sensitivity of the organisms to drying may seem somewhat strange to those who are familiar with the notable powers of survival of dried cells of *Myxophyceae* (cf. LIPMAN, 1941). In this connection it may be remarked that the most striking examples of survival have been found among the spore-forming genera; further that the ability to survive drying is not necessarily antithetical to a requirement of humid surroundings for active growth.

In accordance with the above observations, it has been found desirable to maintain cultures of non-slimy unicellular *Myxophyceae* in liquid media rather than on agar slants. For the same reason, 1% agar has been used in solid media for the filamentous forms, in order to make it easier for each alga to reach its preferred region of growth.

The two obvious physical variables, light and temperature, have not been extensively investigated for these cultures, since it has been found possible to obtain good growth of the blue-green algae under the conditions which are used in this laboratory for the culture of other photosynthetic organisms. The algae have generally been grown in a light incubator at a temperature of 20—25° C. For storage, stock cultures are kept in a window, screened from direct sunlight. These conditions are in general accord with those which have been used by earlier workers.

Mineral nutrition.

Most of the major mineral requirements of the *Myxophyceae* were determined by the early workers [cf. PRINGSHEIM (1913), GLADE (1913), MAERTENS (1914)]. Phosphate, sulfate, and magnesium are generally agreed to be necessary for their growth. In those media to which these and other nutrients to be discussed below have not been added, they may be assumed to have been present in the tap water which many investigators have used to prepare their media. The need for iron was clearly shown by BORESCH (1919), but it is still an open question as to whether these algae require calcium. MAERTENS (1914) found this element necessary for his cultures of *Oscillatoria brevis*, *O. tenuis*, and *Nostoc* sp., while GERLOFF et al. (1950) found it unnecessary for their culture of *Coccochloris peniocystis*. This is probably another case in which there is considerable difference in the requirements of different algae.

Most investigators have used nitrates of one or another sort as the source of nitrogen. PRINGSHEIM, GLADE, and MAERTENS found that their cultures would use nitrites and ammonium salts. The cultures studied here all grow well with ammonium salts. The experiments of SCHLÖSING and LAURENT (1892) suggested the possibility that blue-green algae could obtain their nitrogen from the air, the investigations of BEIJERINCK (1902) made the possibility into a likelihood, but there was for many years considerable doubt as to whether *Myxophyceae* could actually fix molecular nitrogen, or whether the ability of some isolates to grow in media without combined nitrogen was due to the activities of associated nitrogenfixing bacteria. This question was resolved by the work of DREWES (1928), ALLISON et al. (1937), DE (1939), BORTELS (1940) and finally FOGG (1942), which presented conclusive evidence for the fixation of molecular nitrogen by pure cultures of blue-green algae. The evidence so far available, however, suggests that nitrogen fixation is characteristic only of certain types of *Myxophyceae*. In BEIJERINCK's enrichment medium, which contains no added nitrogen, it is *Nostoc* and *Anabaena* which develop abundantly. The cultures used in the above-mentioned critical studies on nitrogen fixation were all cultures of *Nostoc* or *Anabaena*. In a survey of the algae cultured here, all the *Nostoc* strains available grew without added nitrogen, as did some, but not all, of the *Anabaena* isolates. The only other alga to grow well without added nitrogen was *Calothrix parietina*.

BENECKE in 1898 reported on a strain of *Oscillaria tenuis* which grew in a medium in which all the potassium salts had been replaced by sodium compounds. PRINGSHEIM (1913) and MAERTENS (1914) investigated the ability of their cultures to behave in this unusual manner, but obtained only negative results. Later, EMERSON and LEWIS (1942) found sodium to be necessary for the maintenance of steady photosynthesis in a *Chroococcus* sp., and further showed that for this alga it was possible to reduce the potassium concentration in the culture medium to as low as 1 ppm. without ill effects on the growth of the alga.

Similar observations were made in this laboratory during studies of the photosynthesis of *Synechococcus cedrorum*. In potassium buffers photosynthesis fell to nearly zero within 15 minutes; when sodium salts were added, a steady rate of photosynthesis could be maintained for several hours. Maximum rates of photosynthesis were observed when 80% or more of the alkali ion in the buffer was sodium. This observation led to an investigation of the effect of sodium and potassium on the growth of all the myxophycean cultures available, the results of which are shown in Table 4. It will be seen that certain cultures of unicellular *Myxophyceae*, as well as one *Oscillatoria*, not only can grow without added potassium, but require sodium for growth in the presence of potassium; the great majority of the cultures tested appear indifferent as to which alkali ion is the major component of their culture medium; and only the *Nostocs* require an appreciable potassium concentration for growth. The cultures marked * have been carried through three successive transfers in the sodium medium. All cultures which have been so treated have continued to grow, although perhaps not as fast or as abundantly as when K is also added. These experiments were performed with ordinary C. P. chemicals without further purification of the reagents, so that potassium was certainly present in minute amounts in all culture media.

Table 4. Growth in sodium and potassium media.
Medium ALLEN 3.

Alga	(1) sodium; all K salts replaced by Na salts	(2) potassium; all Na salts replaced by K salts	(3) both K and Na salts
<i>Synechococcus cedrorum</i>	+	—	+
<i>Chroococcus turgidus</i>	+	—	+
<i>Chroococcus</i> sp.*	+	—	+
<i>Chroococcus</i> sp. str. B.	+	+	+
Acid alga	+	+	+
<i>Aphanocapsa sescianensis</i>	+	+	+
<i>Gloeocapsa polydermatica</i>	+	+	+
<i>Oscillatoria</i> sp. str. E2*	+	—	+
<i>Oscillatoria</i> sp. str. T5	+	+	+
<i>Oscillatoria princeps</i>	+	+	+
<i>Lyngbya aestuarii</i>	±	+	+
<i>Lyngbya</i> sp. str. 6*	+	+	+
<i>Lyngbya</i> sp. str. 55	+	+	+
<i>Phormidium luridum</i>	+	+	+
<i>Phormidium foveolarum</i> *	+	+	+
<i>Phormidium</i> sp. str. 25	+	±	+
<i>Phormidium</i> sp. str. 76*	+	+	+
<i>Anabaena cylindrica</i>	+	+	+
<i>Anabaena variabilis</i>	+	+	+
<i>Anabaena</i> sp.	+	+	+
<i>Anabaena</i> sp., str. 28a*.	+	+	+
<i>Nostoc muscorum</i>	—	+	+
<i>Nostoc</i> sp. (PRINGSHEIM)	±	+	+
<i>Nostoc</i> sp. str. 2	±	+	+
<i>Nostoc</i> sp. str. 4	±	+	+
<i>Nostoc</i> sp. str. 30	—	+	+
<i>Plectonema notatum</i> *	+	+	+
<i>Calothrix parietana</i>	+	+	+
Unidentified str. 3	+	+	+

The only information found on the trace metal requirements of *Myxophyceae* is in the report of BORTELS (1940) that molybdenum is necessary for nitrogen fixation by blue-green algae. In order to avoid possible inhibition of growth by relatively high concentration of elements such as copper, it has been the practice here to prepare media with glass-distilled water. A solution containing a conventional mixture of trace metals is then added to all media to take care of any possible requirements for such micronutrients¹.

¹ The solution commonly used contained per ml.: B(as H₃BO₃) 0.02 mg; Cu (as CuSO₄ · 5H₂O) 0.1; Fe [as Fe(NH₄)₂(SO₄)₂] 0.2; Mn (as MnSO₄ · 2H₂O) 0.02; Mo (as [NH₄]₂MoO₄) 0.02; Zn (as ZnSO₄ · 7H₂O) 0.15. — 1 ml. was used per liter of culture medium.

It has been known since the publication of MOLISCH (1896) that most of the common soil and water inhabiting *Myxophyceae* prefer a slightly alkaline medium for growth. The first exact measurements of the effect of pH were by MAERTENS (1914), with his cultures of *Oscillaria brevis*, *O. tenuis*, *Nostoc* sp., *Cylindrospermum licheniforme*, and *Calothrix stellaris*. In no case was good growth obtained below pH 7. GERLOFF *et al.* (1950) found that their *Coccochloris peniocystis* did not develop well below pH 8. Similar results have been obtained with the cultures used in this study. Almost all of the cultures develop well at a pH of 8—8.5, and do not grow below pH 7, although one culture (*Oscillatoria A3*) does not grow except in the highly alkaline EMERSON and LEWIS medium, at a pH of 10—11. The other cultures will also develop in this alkaline medium. An exception to this general preference for alkaline media was found by HARDER (1917) with his culture of *Nostoc punctiforme*, which would grow in media containing KH_2PO_4 . An even more striking exception is the acid tolerant alga isolated here which grows in 1 N sulfuric acid.

Organic nutrients.

Because of their occurrence in polluted waters rich in organic matter; because of their frequent associations with other organisms; because of their development in habitats such as roots, where autotrophic nutrition appears to be excluded, the capacity of *Myxophyceae* for heterotrophic growth and the effects of organic matter upon their development have long been a matter of interest.

It has previously been mentioned that the growth of certain *Myxophyceae* is improved by the addition of soil extract, yeast autolysate, casein hydrolysate, glutamate, or citrate to the culture medium, and that for a few cultures such additions are necessary for the development of the algae. The evidence so far available, based on experiments with *Synechococcus cedrorum*, which requires organic additives for growth, suggests that these organic compounds are not themselves used as nutrients by the algae. It appears likely that their function is to form complexes with metallic ions and in some way not as yet understood make them more available to the cell. In the first place, there is the nonspecific character of the materials which can be used. Growth of *Synechococcus* has been obtained not only with yeast autolysate, aspartate, glutamate, and citrate, but also with acetate, butyrate, succinate, malate, tartrate, ketoglutarate, and glutarate. Second, the available evidence indicates no utilization of the organic acids by the algae. This has been tested with butyrate in growing cultures and with citrate in active cell suspensions during several hours of photosynthesis. In neither case was there any detectable disappearance of the organic acid. Further, the presence of these organic acids reduces the proportion of sodium which is required for maintenance of photosynthesis in *Synechococcus*. In the presence of casein hydrolysate, aspartate, or glutamate, the sodium requirement was cut ten to thirty fold.

The mechanism of action of the organic acids requires more study. It has not been possible to eliminate the need for them by variations in the ratio of sodium to potassium, calcium to magnesium, or all of these to phosphate. Neither has it been possible to replace them by the synthetic chelating agent ethylene-diamine tetraacetic acid. It also appears difficult to explain the action of these materials on the sodium requirement by invoking chelation.

The ability of *Myxophyceae* to grow in darkness at the expense of organic nutrients was first reported by BOUILHAC (1897, 1898, 1901), who grew *Nostoc punctiforme* in the dark with sugars, and by BRUNNTHALER (1909), who observed development of *Gloeothece rupestris* in the absence of light at the expense of a variety of organic compounds.

Since neither of the seauthors had pure cultures, their results, while interesting in that they suggest the ability of blue-green algae to compete successfully with bacteria for organic nutrients, are difficult to interpret. The experiments of BRUNNTHALER, in particular, must be questioned, since he also reported growth of his *Gloeocapsa* on mineral media in darkness. PRINGSHEIM (1913) was not able to grow his pure cultures in the dark, and found little, if any, stimulating effect of organic substrates in the light. But illuminated cultures grew well in the presence of organic substances, especially 'Heydennährstoff'. HARDER (1917), on the other hand, succeeded in growing *Nostoc punctiforme* (in pure culture) in the dark on various hexoses, di-, and polysaccharides. Organic substrates were also favorable for growth in the light. ALLISON et al. (1937) grew *Nostoc muscorum* on glucose in the dark and obtained nitrogen fixation under these conditions, as did STOKES (1940).

Of the cultures studied here, *Oscillatoria* sp. E 2, *Oscillatoria* sp. T5, *Lyngbya* sp. str. 6, *Phormidium foreolarum*, *Plectonema notatum*, and *Nostoc muscorum* (ALLISON's strain) grew in the dark at 25° on agar slants containing 5% yeast autolysate and 0.2% glucose. Most of the other strains maintained their color and apparently healthy appearance for weeks in the dark on this medium, but did not multiply visibly. Heterotrophic growth was slow, at best, about a month being required for clearly visible growth. In contrast to their spreading habit of growth in the light, cultures grown in the dark formed thick, compact masses, so intensely blue-green in color as to be almost black. Their low rate of growth has discouraged further experiments with different substrates and other environmental factors. However, it appears possible that more isolates might be induced to grow heterotrophically and the rate of growth of those already observed to develop in the dark might be increased if proper conditions were found, so that the subject demands more investigation.

The only alga in the present collection which grew in the dark at a rate comparable with that in the light was the unicellular acid tolerant alga. Visible growth of this alga was obtained in 3—4 days at 28° C and abundant cultures developed in 6—8 days. The results of experiments

on the heterotrophic nutrition of this organism are shown in Table 5. These results parallel those of HARDER with *Nostoc punctiforme* in showing best growth with sugars.

Table 5. Growth of the acid-tolerant alga in organic media in the dark; carbon sources at 0.2% concentration.

Carbon source	6 days		8 days		10 days	
	In 5% yeast aut.	In mineral medium	In 5% yeast aut.	In mineral medium	In 5% yeast aut.	In mineral medium
None	+	—	+	—	++	—
Glucose	++	++	++	++	+++	++
Fructose	++	++	++	++	++	++
Galactose	++	++	+++	++	+++	++
Lactose	++	—	++	—	++	—
Maltose	++	±	++	++	++	++
Sucrose	++	++	++	++	+++	++
Mannitol	++	+	++	+	++	++
Glycerol	++	±	++	+	++	++
Ethanol	++	—	++	+	++	+
Na acetate	+	—	+	—	+	—
Na succinate	++	±	++	+	++	+
Na citrate	±	—	—	—	—	—
Na glycollate	±	—	—	—	—	—
Na lactate	+	±	+	+	+	+
Na glutamate	++	±	++	+	++	+

In contrast to this apparently limited ability to utilize organic sources of carbon for growth, most *Myxophyceae* which have been studied appear to be able readily to derive their nitrogen from organic compounds. The results of experiments with several organic and inorganic nitrogen sources, in the light, are given in Table 6. It will be noted that casein hydrolysate is an excellent nitrogen source, especially for the unicellular strains, and that intact casein can be used in a large number of cases. These results confirm those of PRINGSHEIM (1913), who found that peptone, asparagin, 'Heydenmährstoff', serum albumin, egg albumin, casein, and legumin were good nitrogen sources for his cultures.

The cultures growing on casein were further investigated to determine whether they indeed possessed the property of proteolysis, which had not previously been reported for members of this group of organisms. Protein-hydrolyzing activity was tested by the method of SMITH (1946). The usual mineral medium No. 3 was mixed with agar and nutrient gelatin to a final concentration of 1% agar and 1% gelatin, poured into plates, and inoculated in spots with the cultures to be tested. After growth of the algae, the plates were flooded with a solution of mercuric chloride in hydrochloric acid, which coagulated undigested protein.

Table 6. Growth of *Myxophyceae* with various nitrogen sources.
Each nitrogen source at 0.1% concentration. Medium ALLEN 3 (*N* omitted) as base.

	No added nitrogen	NaNO ₃	NH ₄ Cl	Casein hydrolysate	Casein	Urea
<i>Synechococcus cedrorum</i>	—	—	—	++	—	—
<i>Chroococcus turgidus</i>	—	+	+	+	+	—
<i>Chroococcus</i> sp.	—	—	—	+	—	—
<i>Chroococcus</i> sp., str. B	—	+	+	++	+	—
Acid alga	—	+	+	+	+	+
<i>Oscillatoria</i> sp. E2	—	+	+	+	+	—
<i>Oscillatoria</i> sp. T5	—	—	—	—	—	—
<i>Lyngbya aestuarii</i>	—	+	+	+	+	—
<i>Lyngbya</i> strain 6	—	+	+	+	+	—
<i>Lyngbya</i> strain 55	—	+	+	+	+	±
<i>Phormidium luridum</i>	—	+	+	+	+	—
<i>Phormidium foveolarum</i>	—	+	+	+	+	—
<i>Phormidium</i> str. 25	—	+	+	+	+	—
<i>Phormidium</i> str. 76	—	+	+	+	+	—
<i>Anabaena cylindrica</i>	—	+	+	±	+	—
<i>Anabaena variabilis</i>	—	+	+	+	+	—
<i>Anabaena</i> sp.	—	+	+	±	+	—
<i>Anabaena</i> sp. str. 28a	—	+	+	+	+	—
<i>Nostoc muscorum</i>	+	+	+	+	+	±
<i>Nostoc</i> sp. (PRINGSHEIM)	+	+	+	+	+	±
<i>Nostoc</i> str. 2	+	+	+	+	+	±
<i>Nostoc</i> str. 4	+	+	+	+	+	—
<i>Nostoc</i> str. 30	+	+	+	+	+	±
<i>Plectonema notatum</i>	—	+	+	+	+	—
<i>Calothrix parietina</i>	+	+	+	+	+	—
Unidentified str. 3	—	+	+	+	+	—

Proteolytic activity, indicated by clear spots around colonies, was found in all the cultures which grew well on casein. All colonies were checked for bacterial contamination, evidence for which was never encountered.

Problems and prospects.

It is hoped that what has already been written will indicate that the isolation of pure cultures of *Myxophyceae*, while somewhat tedious, and while requiring some familiarity with the habits of the organisms for success, is by no means an impossibly difficult undertaking. Nevertheless, any improved techniques which would permit more rapid and easy isolation of cultures would constitute an important advance. For this reason, some experiments of GLADE (1913), which may perhaps point the way to a rapid isolation of pure cultures of spore-forming *Myxophyceae*, appear worthy of mention. GLADE measured the heat resistance of spores of *Anabaena*, *Nostoc*, and *Cylindrospermum* and found that all

of them were capable of withstanding ten to twenty minutes heating at 70° C. Since, within the author's experience, the persistent contaminants of *Myxophyceae* are not sporeforming bacteria, pasteurization may be an important aid to obtaining pure cultures from material containing spores.

The nutrient requirements of those *Myxophyceae* which grow well in the soil-water cultures of PRINGSHEIM (1946, 1950), but which do not develop in the media of known composition so far used also demand investigation. The author has two such cultures, both obtained from Prof. PRINGSHEIM, which have not produced even limited development under any of the conditions which have been used for the nurture of the other algae in the collection.

Finally, it may be stated that pure culture studies will not make their maximum possible contribution to our understanding of the *Myxophyceae* until they have been developed and simplified to such a point that this method of approach will be used not only by the physiologist, who may be willing to spend several months in the isolation of a few cultures, but also by the systematist as a routine part of his procedure of examination of material. The remarks of CHODAT (1913) on the difficulties and dangers attendant on systematic studies of algae which do not include observations of cultures appear especially appropriate when applied to a group of organisms which have an extremely simple morphology and little in the way of a developmental history. The numerous times which GEITLER (1925) remarks 'Die Arten sind oft schwer von einander zu unterscheiden' support the view that for the *Myxophyceae* the introduction of cultural and physiological characteristics as a means of differentiating organisms appears almost as necessary as for the bacteria and microscopic fungi. The results of this study suggest several criteria which might be useful for this purpose; the surface relations of the algae, their capacity for heterotrophic nutrition, their utilization of various nitrogen sources, to name but a few. Much work with a large number of cultures is required to determine which characteristics will be of value, but such work appears necessary if myxophycology is to progress past a stage which resembles that of bacteriology in the first half of the nineteenth century.

It is a pleasure to thank all those who have contributed pure cultures or material from which pure cultures could be isolated. The continued interest of Prof. C. B. VAN NIEL is gratefully acknowledged.

Summary.

1. Previous work on the isolation and cultivation of *Myxophyceae* is reviewed.
2. The methods which have been used to obtain a collection of thirty cultures of various *Myxophyceae* are described.

3. The relation of *Myxophyceae* to the physical conditions of their environment is discussed. It is shown that filamentous *Myxophyceae* develop better when provided with a solid substratum, and that many unicellular blue-green algae do not grow well on an exposed surface.

4. Certain aspects of the mineral nutrition of *Myxophyceae* are discussed. It is shown that some cultures of blue-green algae require sodium for growth, and that a great many others are indifferent as to whether sodium or potassium is the major alkali ion in the media used.

5. It is shown that the addition of small amounts of certain organic materials, especially carboxylic acids, is essential for the culture of a few *Myxophyceae* and is favorable to the growth of many others. It appears most likely that these materials are not used as nutrients by the algae, but rather aid in their mineral metabolism.

6. Several cultures of *Myxophyceae* are shown to have the ability to develop in the dark on organic media. Most of these grow slowly under these conditions and only one culture grows in the dark at a rate comparable to its rate of growth in the light. This alga is also remarkable for its ability to grow in strongly acid solutions, and for the loss of pigments when grown in the dark.

7. The ability of the cultures to use various nitrogen sources is examined. Nitrate and ammonium salts are used by all isolates. Molecular nitrogen is used only by *Nostoc*, *Anabaena*, and *Calothrix* cultures. Amino acids are a good nitrogen source for all cultures and many can use intact casein. These cultures have been shown to be capable of hydrolysing proteins.

Note added in proof: It has been pointed out by Dr. FRANCIS DROUET that the 'acid alga' is very similar in its morphology to *Chlorella variegata* BEIJERINCK. I have been able to confirm this similarity in morphology and developmental history. However, the 'acid alga' has the pigments characteristic of a blue-green alga. Not only does it contain phycocyanin, but also it possesses only chlorophyll a. This situation is reminiscent of the finding by BORESCH (1922) of phycocyanin and phycoerythrin in *Palmettoccus miniatus* CHOD. var. *porphyrea* WILLE. It appears desirable to defer naming the 'acid alga' until more can be learned of these algae which are morphologically *Chlorophyceae* but which contain the pigments characteristic of *Myxophyceae*.

References.

ALLISON, F. E., S. H. HOOVER and H. J. MORRIS: Bot. Gaz. **98**, 433 (1937). — BEIJERINCK, M. W.: Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam **4**, 5 (1902). — BORESCH, K.: Ber. dtsch. bot. Ges. **37**, 25 (1919). — BORESCH, K.: Ber. dtsch. bot. Ges. **40**, 288 (1922). — BORTELS, H.: Arch. Mikrobiol. **11**, 155 (1940). — BOUILHAC, R.: C.R. Acad. Sci. Paris **125**, 800 (1897); **126**, 1583 (1898); **133**, 55 (1901). — BRUNNTHALER, J.: Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturwiss. Kl. I, **118**, 501 (1909). — CATALDI, M. S.: Darwinia, **5**, 228 (1941). — CHODAT, R.: Monographie des Algues en Culture Pure. Berne 1913. — DE, P. K.: Proc. Roy. Soc. B **127**, 121 (1939). —

DREWES, K.: Zbl. Bakt. II Abt. **76**, 88 (1928). — EMERSON, R., and C. M. LEWIS: J. Gen. Physiol. **25**, 579 (1942). — FOGG, G. E.: J. Exper. Biol. **19**, 78 (1942). — FRITSCH, F. E.: The Structure and Reproduction of the Algae, vol. 2. Cambridge 1945. — GEITLER, L.: Cyanophyceae: Die Süßwasserflora Deutschlands usw., Heft 12. Jena 1925. — GERLOFF, G. C., C. P. FITZGERALD and F. SKOOG: in: The culturing of Algae. A Symposium, Ed. by J. Brunel, G. W. Prescott and L. H. Tiffany, pp. 27—44. Antioch Press 1950. — GLADE, R.: Beitr. Biol. Pflanz. **12**, 295 (1913). — HARDER, R.: Z. Bot. **9**, 145 (1917). — LIPMAN, C. B.: Bull. Torrey Bot. Club **68**, 664 (1941). — MAERTENS, H.: Beitr. Biol. Pflanz. **12**, 439 (1914). — MOLISCH, H.: Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturwiss. Kl. I, **104**, 783 (1896); **105**, 633 (1897). — MOLISCH, H.: Pflanzenbiologie in Japan. Jena 1926. — PRINGSHEIM, E. G.: Beitr. Biol. Pflanz. **12**, 49 (1913). — PRINGSHEIM, E. G.: Pure Cultures of Algae, Cambridge Univ. Press (1946). — PRINGSHEIM, E. G.: in: The culturing of Algae. A Symposium, Ed. by J. Brunel, G. W. Prescott, and L. H. Tiffany, pp. 19—26. Antioch Press 1950. — RICHTER, A.: Flora **75** (1892). — SCHLÖSING, Fils, and LAURENT: Ann. Inst. Pasteur **6**, 832 (1892). — SMITH, N. R.: Misc. Publ. U. S. Dept. Agr. No. 559, p. 33 (1946). — STOKES, J. L.: Soil Sci. **49**, 265 (1940). — TISCHUTKIN, N.: Zbl. Bakt. II, **3**, 183 (1897).

(Aus dem Institut für Pflanzenernährungslehre und Bodenbiologie der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim in Stuttgart-Hohenheim.)

Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Azotobactergehalt und Bodenfruchtbarkeit.

Von
HUBERT WICHTMANN.

(Eingegangen am 22. Oktober 1951.)

Es ist bei den zahlreichen, sich widersprechenden Ergebnissen von *Azotobacter*-Impfversuchen nicht verwunderlich, daß die Ansichten über die Bedeutung von *Azotobacter* für die Bodenfruchtbarkeit auseinandergehen. Auf der einen Seite stehen die meist günstigen Ergebnisse vor allem der russischen Forscher, die man mit ALLISON (1947) nicht ohne weiteres als unzuverlässig ablehnen darf; auf der anderen Seite zeigen die eigenen Versuche von ALLISON und Mitarbeitern (1947) — zum Teil mit russischen Originalimpfstoffen durchgeführt — sowie die umfangreichen Versuche von O. C. SCHMIDT (1948, 1949) bis in die neueste Zeit die Unwirksamkeit oder Unzuverlässigkeit der *Azotobacter*-Impfung. Falls es nun unter irgendwelchen Bedingungen möglich ist, durch *Azotobacter* einen Mehrertrag zu erzielen, scheint es berechtigt, bei einem Versagen der Impfung von irgendwelchen Mängeln in der Versuchsanordnung zu sprechen, vorausgesetzt, daß man den Begriff dieser Mängel ganz weit faßt, also alle Wachstumsfaktoren wie Boden, Klima, Pflanze und spezifische Eigenschaften des *Azotobacter*-Stammes miteinbeschließt. Bei der Mannigfaltigkeit dieser Faktoren ist natürlich die Unsicherheit eines Urteiles über die Beziehungen zwischen *Azotobacter*-Gehalt und Bodenfruchtbarkeit groß, und endgültige Klarheit kann ein Versuch darüber nicht geben; auch wenn die größte Sorgfalt darauf gelegt wird, die für *Azotobacter* günstigsten Versuchsbedingungen zu schaffen, erscheint es noch möglich, daß irgendein entscheidender Faktor übersehen wird.

Bei den eigenen Versuchen galt es, von vornherein einer Schwierigkeit aus dem Wege zu gehen. Wie man aus den Arbeiten von POSCHENRIEDER (1930, 1949) und STARC (1943) ersieht, gehen die Meinungen darüber auseinander, ob *Azotobacter* in der Rhizosphäre der Pflanzen günstige Lebensbedingungen findet. Auch russische Forscher (FEDOROV, 1945) sind der Ansicht, daß eine Wirkung von *Azotobacter* davon abhängig sei, ob sich die an den geimpften Samen befindlichen *Azotobacter*-Keime in der Rhizosphäre durchsetzen oder nicht. Um *Azotobacter* bei den eigenen Versuchen auf jeden Fall das Übergewicht im Boden zu verschaffen,

wurde versucht, ihn durch besondere Zufuhr in den Boden stark zu vermehren. Es galt also, 1. *Azotobacter* im Boden anzureichern, 2. das Verhalten von *Azotobacter* im Boden zu beobachten, 3. die Wirkung einer vorübergehenden oder dauernden *Azotobacter*-Anreicherung auf den Ertrag festzustellen.

Bestimmend für die Wahl der Versuchsbedingungen war die Absicht, die verschiedenen Möglichkeiten einer *Azotobacter*-Wirkung zu berücksichtigen. Eine Stickstoffwirkung (SHELOUMOVA, 1933) konnte sich am besten in den Gefäßen ohne Stickstoffdüngung zeigen, die Förderung des Pflanzenwachstums durch Wuchsstoffe (KRONBERGER, 1949) vielleicht nur bei genügender N- oder besonders guter P-Versorgung. Eine nährstoffaufschließende Wirkung (KAS, 1929) dagegen mußte man bei „ungedüngt“ am besten messen können, und eine erhöhte Widerstandskraft gegen schädliche Einflüsse im Sinne der russischen Forscher BEREZOVA und Mitarbeiter (1938) konnte sich überall zeigen, wenn tatsächlich irgendwelche Schädigungen — vielleicht durch den wiederholten Anbau der gleichen Frucht — auftraten.

Als Versuchspflanze diente *Senf*, der nach Untersuchungen von HILTNER (1915) und POSCHENRIEDER (1929, 1930) für eine *Azotobacter*-Impfung besonders geeignet scheint.

Zur Anreicherung von *Azotobacter* wurde ein „angepaßter“ Handelsimpfstoff für *Cruciferen* verwendet und zum Vergleich eine *Azotobacter*-Rohkultur — gewachsen in BEIJERINCKScher Mannitnährösung — hinzugezogen. Mit 1 g Handelsimpfstoff wurden jedem behandelten Gefäß über 10 Millionen *Azotobacter*-Keime hinzugefügt. Die Untersuchung wurde auf 2 verschiedenen, in Tab. 1 gekennzeichneten Böden, vorgenommen.

Tabelle 1. Die verwendeten Böden und deren Eigenschaften.

	Filderboden	Albboden
Geologische Entstehung und Herkunft	Lias, Institutsgelände Hohenheim	Weißjura, Hohenstadt bei Geislingen/Steige
mg P ₂ O ₅ } je 100g Boden	0,4	2,1
mg K ₂ O } (Lactatwerte)	5,7	9,8
pH { in KCl	5,20	6,93
{ in H ₂ O	6,57	7,67
Besonderes	schwerer Lehmboden aus dem Untergrund einer landw. nicht genutzten Fläche.	Lehmober aus der Ackerkrume, durchsetzt mit zahlreichen unverwitterten Stückchen kohlensauren Kalkes.

Weißgestrichene Tongefäße von 25 cm Tiefe und Durchmesser, austariert mit etwa 2 kg Grobsand. Sie erhielten eine Füllung von 8 kg Boden und 4 kg Feinsand, eine Mischung, die zur Vergrößerung und Stabilisierung des Porenvolums angebracht schien. Mit beiden Böden und je 4 Wiederholungen wurden die PK- und NPK-Glieder, das Kernstück des Versuchs, angelegt, während für NP₂K, N₂PK und „ungedüngt“ nur der Albboden mit je 3 Wiederholungen benutzt wurde.

Die PK-Grunddüngung, bestehend aus 0,8 g P₂O₅ und 1,8 g K₂O, wurde in Form von Thomasphosphat und Kalidüngesalzen, gemischt aus Kaliumsulfat und Kainit,

gegeben wegen ihres Gehaltes an im Boden vielleicht fehlenden Hochleistungsstoffen. Die NPK-Gefäße erhielten zuzüglich 0,5 g N als NH_4NO_3 , die NP_2K -Glieder zu dieser Volldüngung weitere 0,8 g P_2O_5 als Superphosphat beim Ansetzen des Versuchs und die N_2PK -Glieder weitere 0,5 g N als NH_4NO_3 als Kopfdüngung. Um eine vielleicht vorhandene Düngewirkung des Impfstoffes zu erfassen, wurde den Gefäßen „ungeimpft-ungedüngt“ 1 g sterilisierten Handelsimpfstoffes hinzugefügt.

Eine Übersicht über die Düngungs- und Behandlungsweisen gibt der Versuchsanplan in Tab. 2, in dem die einzelnen Reihen mit den Abkürzungen angeführt sind, die im späteren Text angewendet werden: für die Düngungsweisen die Ziffern von I—V, für die Behandlungsweisen die Buchstaben U = ungeimpft, Ro = *Azotobacter*-Rohkultur, Ha = *Azotobacter*-Handelsimpfstoff.

Tabelle 2. *Versuchsanplan*.

Behandlungsweise Düngungsweise	Ungeimpft	<i>Azotobacter</i> - Rohkultur ¹	<i>Azotobacter</i> - Handelsimpfstoff
PK-Düngung	I—U	I—Ro	I—Ha
NPK (Volldüngung) . . .	II—U	II—Ro	II—Ha
Volldüngung, P verdoppelt	III—U	III—Ro	nicht durchgef.
Volldüngung, N verdoppelt	IV—U	IV—Ro	nicht durchgef.
ungedüngt	V—U	nicht durchgef.	V—Ha

¹ Für die Überlassung der benutzten *Azotobacter*-Rohkultur sowie für die Anleitung zum bakteriologischen Arbeiten in seiner Abteilung sei Herrn Dr. BURCIK und dem Direktor des Botanischen Instituts, Herrn Prof. Dr. WALTER, auch an dieser Stelle bestens gedankt.

Die Versuche des Jahres 1949.

In der Reihenfolge „Ungeimpft, *Azotobacter*-Rohkultur, *Azotobacter*-Handelsimpfstoff“ wurde der Versuch am 5., 6. und 7. Juli angesetzt. Hierbei erhielt die erste Gruppe je 75 cm³ BEIJERINCKSche Mannitnährösung, die zweite je 75 cm³ einer *Azotobacter*-Rohkultur, gewachsen in der gleichen Nährösung, und die dritte je 1 g Handelsimpfstoff in ebenfalls der gleichen Menge BEIJERINCKScher Mannitnährösung.

Vegetationsbeobachtungen und Ernteerträge der 1. und 2. Tracht 1949.

Am 12. 7. mit Senf angesät, zeigte der Versuch beim Auflaufen und ersten Wachstum der Pflänzchen keine, bis zum 27. 7. nur Unterschiede zwischen mit und ohne Stickstoffgabe. Zur besseren Luftzufuhr wurden jetzt die durch das Gießen gebildeten Krusten mit abgeflammten Glassstäbchen oberflächlich gelockert und die Gefäße seitdem durch die seitlichen Luftröhren begossen. Auch im weiteren Wachstum zeigten sich keine erwähnenswerten Unterschiede zwischen geimpft und ungeimpft außer bei Düngung II-Ha Filderboden, die gegen II-U und II-Ro beachtlich besser stand. Als am 22. 8. der Versuch bei Blühbeginn geerntet

wurde, waren bei diesen Pflanzen die Keim- und unteren Laubblätter bereits im Stadium des Vergilbens, während die Pflanzen der Düngung II-Ha noch in vollem Wachstum standen.

Am 23. 8. wurden die Gefäße erneut saatfertig gemacht. Der Boden wurde bis zu einer Tiefe von etwa 20 cm ausgehoben, die Wurzelmasse zerschnitten und das Ganze gut vermischt ins Gefäß zurückgegeben. Um eine Bakterienübertragung zu vermeiden, wurden zuerst die ungeimpften, zuletzt die geimpften Gefäße bearbeitet. In der 2. Tracht wurde auf das obenerwähnte Brechen der sich beim Gießen bildenden Bodenkruste verzichtet, da vermutet werden konnte, daß die zum Teil hohen Streuungen der Erntergebnisse in der 1. Tracht auf diese Bodenbearbeitung zurückgingen.

Unterschiede zeigten sich auch in der 2. Tracht zwischen den Reihen mit und ohne Stickstoff (Nachwirkung), während die verschiedenen Behandlungsweisen auch diesmal keine Wirkung erkennen ließen. Die Düngung II-Ha auf Filderboden blieb ab 15. 9. mehr und mehr hinter ihren

Tabelle 3. Ernteerträge von Senf 1949 in g Trockenmasse; N-Gehalt in mg und %.

Zeichen und Düngung	Behandlung	g Trockenmasse			N-Gehalt	
		1. Ernte	2. Ernte	1. u. 2. Ernte	mg	in %
<i>Filderboden</i>						
I—U	ungeimpft	8,8 ± 0,49	5,1 ± 0,25	13,8 ± 0,32	179,2	1,29
I—Ro	Az.-Rohkult.	8,1 ± 0,05	5,8 ± 0,33	13,9 ± 0,28	179,4	1,29
I—Ha	Az.-Handel	8,0 ± 0,17	5,1 ± 0,08	13,1 ± 0,18	168,1	1,29
II—U	ungeimpft	19,5 ± 1,21	15,7 ± 0,61	35,2 ± 0,63	464,0	1,32
II—Ro	Az.-Rohkult.	16,9 ± 1,01	19,0 ± 1,03	35,9 ± 1,10	453,1	1,26
II—Ha	Az.-Handel	21,0 ± 0,83	9,7 ± 0,65	30,7 ± 0,79	455,1	1,48
<i>Albboden¹</i>						
I—U	ungeimpft	8,7 ± 0,21	5,8 ± 0,12	14,5 ± 0,42	185,4	1,28
I—Ro	Az.-Rohkult.	6,6 ± 0,17	5,0 ± 0,12	11,5 ± 0,21	151,9	1,32
I—Ha	Az.-Handel	8,3 ± 0,42	4,8 ± 0,28	13,0 ± 0,40	165,9	1,28
II—U	ungeimpft	14,8 ± 0,45	18,2 ± 0,38	33,0 ± 0,60	466,2	1,41
II—Ro	Az.-Rohkult.	14,6 ± 0,92	18,1 ± 0,22	32,7 ± 0,67	433,6	1,33
II—Ha	Az.-Handel	13,4 ± 0,46	18,3 ± 0,36	31,6 ± 0,32	433,5	1,37
III—U	ungeimpft	20,7 ± 0,38	14,1 ± 1,98	34,8 ± 1,60	463,0	1,33
III—Ro	Az.-Rohkult.	20,8 ± 2,76	11,5 ± 3,00	32,3 ± 0,23	452,9	1,40
IV—U	ungeimpft	21,8 ± 0,74	22,4 ± 0,63	44,3 ± 0,18	706,6	1,60
IV—Ro	Az.-Rohkult.	22,8 ± 1,68	19,2 ± 2,35	42,0 ± 0,63	688,9	1,64
V—U ungedüngt	ungeimpft	6,8 ± 0,61	3,8 ± 0,26	10,6 ± 0,32	173,2	1,64
V—Ha unged.	Az.-Handel	5,1 ± 0,29	3,4 ± 0,19	8,5 ± 0,25	149,6	1,76

¹ I—Ha und II—Ha auf Albboden erhielten den Impfstoffzusatz in Wasser statt in BEIJERINCKScher Mannitnährösung; der Vergleich mit den entsprechenden Reihen des Filderbodens ergibt kein klares Bild von einer etwaigen Nebenwirkung der in der Nährösung enthaltenen Menge von 1,5 g Mannit auf den Ertrag.

Vergleichsreihen zurück, so daß die oben geschilderte *Azotobacter*-Wirkung in der 1. Tracht wohl nicht einer besseren Stickstoffversorgung (Stickstoffbindung) durch Bakterien, sondern einer stärkeren Ausnutzung des Bodenvorrats zuzuschreiben ist. — Ernte bei Blühbeginn am 4. 10.

Tab. 3 zeigt, daß die *Azotobacter*-Impfung keine Erhöhung der Ernterträge in der 1. und 2. Tracht brachte. Vergleicht man die Gesamterträge der geimpften mit denen der ungeimpften Reihen, so stellt man eher die Tendenz zu einer Ertragsverminderung fest, denn nur in zwei Fällen — bei I-Ro und II-Ro Filderboden — erreichen die Erträge der geimpften jene der ungeimpften Gefäße. Wie die N-Analysen in Tab. 3 zeigen, ist auch weder eine Erhöhung des Stickstoffgesamtertrages noch des Prozentgehaltes durch die Impfung eingetreten.

Beobachtungen über das Verhalten von *Azotobacter* im 1. Versuchsjahr.

Es sollte versucht werden, den Einfluß der verschiedenen Behandlungs- und — wenn möglich — auch Düngungsweisen auf den *Azotobacter*-Bestand der beiden Böden zu ermitteln, um die durch die Bodenimpfung zu erwartende Anreicherung und die im Laufe der Vegetation möglichen Veränderungen zu erfassen.

Zur Bestimmung des *Azotobacter*-Gehalts wurde das Verdünnungsverfahren, kombiniert mit der elektiv wirkenden BEIJERINCKSchen Mannitnährösung, verwendet. Diese Methode liefert zwar keine absoluten Keimzahlen, ist aber nach den Erfahrungen von DÜGGELI (1924) wesentlich besser geeignet als das Anlegen quantitativ gehaltener Gußkulturen mit Mannitagar. Dabei wurde in der 1. und in der 2. Tracht im Abstand von etwa 14 Tagen je ein Gefäß aller Versuchsglieder untersucht. Wie aus folgendem Schema ersichtlich, liegen die Parallelbestimmungen im einzelnen Gefäß dann etwa 2 Monate auseinander:

*Versuchsglied PK-ungeimpft auf Filderboden;
Daten der Untersuchung des Bodens auf Azotobacter.*

Gef. Nr.	1. Tracht	2. Tracht
111	19. 7.	13. 9.
112	5. 8.	27. 9.
113	19. 8.	11. 10.

Daß hier die Methodik bis ins einzelne beschrieben wird, scheint nach allgemeiner Erfahrung nötig, wurde doch gerade bezüglich der Bakterienzählung im Boden festgestellt (SMITH, 1925, LÖHNIS-GLATHE, 1935), daß die angewendete Methode die Ergebnisse stark beeinflussen kann.

Bei der Entnahme der Bodenproben galt es, sorgfältig darauf zu achten, daß eine Bakterienübertragung unterblieb. Mit abgeflammtem Bodenprobenehmer wurden an mehreren Stellen Teilproben aus einer Tiefe von 0—20 cm entnommen und in sterilen Wägeläschchen mit abgeflammtem Glasstäbchen gründlich vermischt.

Das Gewicht der Gläschchen mit Inhalt wurde festgestellt, darauf mit abgeflammtem Substanzlöffel etwa 5 g entnommen und in 100 cm³ sterile Mannitnährösung eingebracht. Durch Abspülen des Substanzlöffels in der Nährösung wurden auch etwa anhaftende Bodenteilchen erfaßt; die entnommene Menge Boden wurde durch Rückwiegen der Wägegläschchen ermittelt.

Um genaue und vergleichbare Werte zu erhalten, wurde nach dem Anlegen der Verdünnungskulturen jede Bodenaufschwemmung durch ein Sieb gelassen und der Anteil der Bodenteilchen über 0,5 mm Korngröße bestimmt; dieser Wert wurde von der ursprünglichen Einwaage abgezogen. Außerdem wurde der Wassergehalt der Proben festgestellt und berücksichtigt. Die Bodeneinwaage in den Tab. 4—6 gibt also die Menge Bodentrockensubstanz unter 0,5 mm Korngröße an, die zur Herstellung der Aufschwemmung verwendet wurde. Die Angabe der Verdünnungsstufe in Form der Zahlen 2, 3, 4 usw. bezieht sich dagegen stets auf 1 g Rohboden bei einer ungefährnen Gesamteinwaage von 5 g Rohboden im Jahre 1949 und 10 g Rohboden im Jahre 1950 und bedeutet einheitlich die Verdünnungen 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000 usw. Zuletzt wurde zur Herstellung der Bodenaufschwemmung also die doppelte Menge Boden verwandt als im Vorjahr, schien es doch möglich, durch höhere Bodeneinwaagen die Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen, was aber nicht der Fall ist, wie Tab. 6 zeigt.

Zur Herstellung der Aufschwemmung bereits die BEIJERINCKSche Mannitnährösung statt des sonst üblichen Leitungswassers zu nehmen, erschien angebracht, um das von anderen Autoren (HILTNER, 1903, WAKSMAN, 1927) berichtete Abnehmen der Keimzahlen während längeren Stehenlassens der Aufschwemmung zu vermeiden. Es ist allerdings nicht wahrscheinlich, daß *Azotobacter* in dieser Hinsicht ebenso empfindlich ist wie andere Organismen. Als später die Aufschwemmung in Leitungswasser gemacht wurde, war kein Einfluß auf die Az.-Zahlen festzustellen, obschon zwischen Einwiegen der Bodenproben und Anlegen der Verdünnung — dazwischen 40 minütiges maschinelles Schütteln — eine Zeitspanne von 2 Std lag.

Die Verdünnungskulturen wurden in 100 cm³ ERLENMEYER-Kölbchen mit 25 cm³ BEIJERINCKScher Mannitnährösung angelegt, die einen Zusatz von 2% Erdextrakt erhielt. Eine 20minutige Sterilisation der Kölbchen im Dampftopf erwies sich als ausreichend. Die stets vorhandenen Parallelen zeigten nie Wachstum von *Azotobacter*.

Bei einer Bruttemperatur von 28—30° C zeigten sich schon bald die ersten Unterschiede zwischen geimpft und ungeimpft. Nach 3—4 Tagen bemerkte man eine zunehmende Trübung der geimpften Kulturen bei Verdünnung von 1 : 20, die anscheinend durch im mikroskopischen Präparat zahlreich vorhandene, *Azotobacter*-ähnliche, etwa 1 μ große Kokken hervorgerufen wurde. Meist bildete sich nach 6—10 Tagen bei den geimpften Kulturen dieser Verdünnungsstufe eine zusammenhängende *Azotobacter*-Kahmhaut mit manchmal gelblich schleimigem, manchmal pergamentartigem Aussehen. Sie enthielt hauptsächlich typische, gekörnte *Azotobacter*-Zellen mit deutlicher Membran.

Eine solche Kahmhaut trat bei den ungeimpften Kulturen nie auf; hier war nach 10 Tagen starke Blasenbildung verbunden mit Buttersäuregeruch wahrnehmbar. Typische *Azotobacter*-Zellen, die nach 6—7 Tagen ohne Schwierigkeiten im mikroskopischen Präparat noch gefunden wurden, konnte man nach 10 Tagen hier kaum mehr feststellen.

In der Art der Kahmhautbildung (Verdünnung 1 : 20) bei geimpft waren insofern Unterschiede vorhanden, als die mit der *Azotobacter*-Rohkultur geimpften Reihen manchmal am Schluß der Beobachtungszeit — also nach 12 Tagen — eine mehr oder minder starke braune bis schwarze Pigmentbildung zeigten, die bei geimpft mit Handelsimpfstoff nie eintrat.

Die höheren Verdünnungen ließen ein Wachstum von *Azotobacter* makroskopisch nicht immer erkennen. Meist wurde eine leichte Trübung in der Nährösung erzeugt, manchmal auch ein Schleimring am Glase, doch Sicherheit über die Gegenwart von *Azotobacter* konnte stets erst die mikroskopische Prüfung ergeben, da bisweilen auch eine nicht durch ihn hervorgerufene Trübung eintrat und manchmal auch die Trübung in *Azotobacter*-haltigen Kulturen ausblieb. Auch im mikroskopischen Präparat war es oft nicht leicht zu entscheiden, ob eine Kultur *Azotobacter* enthielt oder nicht; es waren oft schemenhaft blaß-gefärzte Organismen mit *Azotobacter*-Ähnlichkeit zu sehen, unter denen man bisweilen nach erst sehr sorgfältiger Beobachtung typisch gekörnte *Azotobacter*-Formen mit deutlicher Zellmembran feststellen konnte. Bemerkenswert ist weiter, daß mehrmals in einer höheren Verdünnung, z. B. 1 : 100000, *Azotobacter* festgestellt werden konnte, während er in der niedrigeren, z. B. 1 : 10000, fehlte bzw. nur in einer der beiden Parallelen vorhanden war (derartige Befunde sind in den Tabellen über den *Azotobacter*-Bestand der Böden eingeklammert angegeben).

Da Schwierigkeiten bei der Entscheidung, ob *Azotobacter* in einer Kultur vorhanden war oder nicht, oft auftraten, wurde nach einer Verbesserung des Verfahrens gesucht. Wenn irgendwelche antagonistische Effekte eine Rolle spielen, hätte sich der Zusatz keimfreier Filtrate, gewonnen aus solchen Kulturen, in denen *Azotobacter* gut gewachsen war, zu der sterilen Nährösung günstig auswirken können.

Kulturen der Verdünnungsstufen 1 : 20 und 1 : 100, die durch Kahmhaut bzw. Trübung und mikroskopische Prüfung sich als besonders reich an *Azotobacter* auswiesen, wurden mit dem Filterapparat von SEITZ mit entsprechenden EK-Filttern abfiltriert. Zur Sterilisation wurde der Apparat auf einen mit Wattebausch verschlossenen Erlenmeyer-Kolben von 200 cm³ aufgesetzt und 1 Std bei 160—170°C im Heißluftsterilisator gehalten. Die Filtration der ziemlich dickflüssigen Kulturen ging nur sehr langsam vonstatten; obwohl mit 2—3 Atm. Überdruck gearbeitet wurde, lief das wasserhelle Filtrat nur tropfenweise ab. Erst in 2—3 Std sammelten sich kaum 100 cm³ der klaren Flüssigkeit an. Hiervon wurden je 1 cm³ in die sterilisierten, mit Nährösung versehenen Kölbchen mit steriler Pipette eingebracht.

Tatsächlich förderte der Zusatz von solchem Filtrat das Wachstum von *Azotobacter* in auffallender Weise. Mit Filtrat versehene Kölbchen der Verdünnungsstufe 1:20 bildeten auch bei ungeimpft eine typische *Azotobacter*-Kahmhaut, und bei den höheren Verdünnungen der geimpften Reihen trat bei Filtratzusatz eine stärkere Trübung bzw. sogar eine leichte Kahmhautbildung ein. Doch wurden Versuche in dieser Richtung bald wieder aufgegeben; es zeigte sich nämlich, daß der Filtratzusatz in Kontrollröhren mit Bodenextrakt + 2% Mannit Wachstum hervorrief. Unter den verschiedenen Formen fielen vor allem zahlreiche Kokken von etwa 1 μ Größe auf, die sich von *Azotobacter* dadurch unterschieden, daß sie kleiner waren und nicht in den sonst beobachteten Zellverbänden,

sondern meist als Mono- oder auch Diplokokken auftraten. Auch fehlten die charakteristischen Schleimhöfe um die Zellen. Allerdings nahmen diese Kokken im Laufe von 5 Wochen an Größe zu, so daß sie von *Azotobacter* kaum mehr zu unterscheiden waren.

Daß keine normalen *Azotobacter*-Zellen in dem auf oben beschriebene Art gewonnenen Filtrat vorhanden waren, geht daraus hervor, daß sich bei wiederholten Versuchen kein Wachstum von *Azotobacter* auf Bodenextraktagarplatten zeigte. Vielmehr wuchsen bei 28° C auf der Oberfläche der mit 1 cm³ Filtrat gegossenen Platten einzelne kleine Kolonien gramnegativer Mikrokokken, die sich mit Carbol-Fuchs in gut und einheitlich färbten. Dieselben Mikrokokken wuchsen auch bei späteren Filtrationsversuchen, bei denen die *Azotobacter*-haltigen Kulturen vorfiltriert und anschließend bei nur 1 Atm. (KONRICH, 1938) keimfrei filtriert wurden. Die Mikrokokken wuchsen üppig auf Kartoffelagar.

Auch der Zusatz von 0,05% Agar, der nach RIPPEL (1936) das Wachstum von *Azotobacter* in Nährösungen verbessert, brachte keine befriedigenden Ergebnisse; es zeigte sich ein stärkeres Wachstum auch anderer Bakterien, ohne daß *Azotobacter* in diesen Rohkulturen speziell gefördert worden wäre (bei den R.'schen Versuchen handelte es sich um solche mit Reinkulturen). Einwandfrei war das Wachstum von *Azotobacter* makroskopisch erst erkennbar in ASHBY-Nährlösung oder in BEIJERINCKScher Nährlösung, der man die von BORTELS (1936) angegebenen Mengen Molybdän zusetzt.

Diskussion der Versuchsergebnisse aus dem Jahre 1949.

Die Tab. 4 und 5 bringen die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen. Sie zeigen, daß es gelungen ist, den *Azotobacter*-Gehalt beider

Tabelle 4. *Azotobacter* im Filderboden Juli—Oktober 1949.
2—5 = Verdünnungsstufen (2 = 1:100 usw.)

Behandlung und Düngung	Ungeimpft		<i>Az.</i> -Rohkultur		<i>Az.</i> -Handelsimpfstoff		Datum
	Boden-ein-waage g	<i>Azotob.</i> -Gehalt	Bodenein-waage g	<i>Azotob.</i> -Gehalt	Bodenein-waage g	<i>Azotob.</i> -Gehalt	
PK	3,65	2—3	3,85	3—4	3,50	3—4(5)	19. 7.
	3,39	4	3,98	3—4(5)	3,30	4	13. 9.
	3,50	2	3,46	3—4	3,31	4	5. 8.
	3,42	2	3,56	2—3	4,02	4	27. 9.
	3,31	2	3,58	2—3	3,35	3—4	19. 8.
	3,29	2	3,37	4—5	3,23	4	11. 10.
NPK	3,82	2—3	3,71	3—4(5)	3,68	3—4	
	3,37	2	3,71	4—5	3,18	3—4	
	3,43	2	3,62	3—4	3,65	3	wie oben
	3,16	2	3,98	3	3,54	4	
	3,52	2	3,53	3—4	3,67	3—4	
	3,64	2	3,32	4	2,94	4—5	

Böden durch die Impfung beträchtlich zu erhöhen, ohne daß sich allerdings ein positiver Einfluß auf das Pflanzenwachstum feststellen ließe. Außer in zwei Fällen hat sich die Anreicherung von *Azotobacter* auf die Ernteerträge sogar negativ ausgewirkt (vgl. dazu Tab. 3).

Tabelle 5. *Azotobacter im Albboden, Juli—Oktober 1949.*

1—5 = Verdünnungsstufen (2 = 1 : 100 usw.).

Behandlung und Dünung	Ungespritzt		<i>Az.-Rohkultur</i>		<i>Az.-Handelsimpfstoff</i>		Datum
	Boden-ein-waage g	<i>Azotob.</i> -Gehalt	Boden-ein-waage g	<i>Azotob.</i> -Gehalt	Boden-ein-waage g	<i>Azotob.</i> -Gehalt	
PK	3,64	2	3,56	3	3,63	3	22. 7.
	3,29	1	3,10	4	3,51	3—4(5)	14. 9.
	3,52	1	3,79	2	3,28	2—3	6. 8.
	3,03	2	3,12	4	3,45	4—5	28. 9.
NPK	2,70	1	3,06	2—3	2,67	3	20. 8.
	3,41	1	2,98	4—5	3,35	5	12. 10.
	3,07	2	3,59	3—4	2,71	3—4	
	2,83	1	3,09	4—5	3,40	4—5	
NP ₂ K	3,62	1	3,33	2—3	2,66	2	wie oben
	3,06	1	2,88	4	2,62	4—5	
	3,24	2	2,83	3	2,85	4	
	2,81	1	3,45	3—4	2,79	4—5	
N ₂ PK	3,80	2	4,00	4			
	2,63	1	3,20	3			
	3,01	1	3,40	3—4	nicht ausgeführt		wie oben
	2,65	1	3,17	3			
unge-düngt	3,15	1	3,10	3			
	2,59	1	3,48	3 (5)			
	3,74	2	4,24	4			
	2,90	2	2,90	3			
	3,67	2—3	3,95	2—3	nicht ausgeführt		wie oben
	2,73	2—3	3,50	3			
	2,67	2	3,66	3			
	2,81	1	2,80	3			
	3,05	2			3,40	3	
	2,45	1			2,99	3—4	
	2,91	2—3	nicht ausgeführt		4,06	2—3	
	3,04	1			2,91	4—5	wie oben
	3,10	1			3,34	3	
	2,96	1			2,34	4	

Aus den Bodenuntersuchungen geht ferner hervor, daß sich die Unterschiede im *Azotobacter*-Gehalt zwischen geimpft und ungeimpft im Laufe der Vegetation nicht geändert haben. Eine Wirkung der verschiedenen Düngungsweisen und des Pflanzenwachstums auf die *Azotobacter*-Zahlen konnte mit Hilfe der angewandten Methodik nicht nachgewiesen werden, vielleicht weil das angewandte Verdünnungsverfahren tatsächlich vorhandene kleine Unterschiede nicht erfassen kann. Doch auch ganz abgesehen von der Ungenauigkeit der Verdünnungsmethode, die durch die großen Abstände von einer Verdünnungsstufe bis zur nächsten gegeben ist, befriedigt die Genauigkeit der Ergebnisse nicht. Vergleicht man die Einwaagen mit den *Azotobacter*-Zahlen und ferner bei den einzelnen Töpfen die Ergebnisse der ersten Untersuchung mit denen der zweiten, so kann man weder hier noch dort eine Erklärung für die oft nicht geringen Unterschiede in der Keimzahl bei den gleichen Behandlungsweisen und in denselben Gefäßen finden.

Trotz diesen Unregelmäßigkeiten steht die Erhöhung des *Azotobacter*-Gehaltes in allen geimpften Reihen auf beiden Böden außer Zweifel, und es ist erstaunlich, daß sie nicht zu einem Mehrertrag geführt hat. Bei der ersten Ernte hätte man annehmen können, daß *Azotobacter* zwar tätig gewesen und Stickstoff aus der Luft assimiliert hätte, daß dieser Stickstoff aber noch in den *Azotobacter*-Zellen festgelegt sei. Da sich aber der darin enthaltene Stickstoff nach ENGEL (1931) im Boden verhältnismäßig rasch umsetzt, hätte man wenigstens zur zweiten Ernte ein anderes Ergebnis erwartet, ganz abgesehen davon, daß nach KOSTYTSCHEW und SHELOUMOW (1931) sowie WINOGRADSKY (1935) *Azotobacter* auch im lebenden Zustand Ammoniak bilden und so vielleicht den Pflanzen direkt zur Verfügung stellen kann. Wie jedoch aus den Ergebnissen der Stickstoffanalysen in Tab. 3 hervorgeht, ist kein Mehrertrag an Stickstoff eingetreten.

Da keine Schädigungen der Pflanzen durch Krankheiten außer bei einem — allerdings geimpften — Topf auftraten, war nicht festzustellen, ob *Azotobacter* die Widerstandsfähigkeit der Pflanzen erhöht. Auch eine Wuchsstoffwirkung war nicht festzustellen.

Die Versuche des Jahres 1950.

Mit halber Wassersättigung wurden die Vegetationsgefäße im Herbst 1949 in einen kühlgelegenen Keller des Instituts zum Überwintern eingestellt. — Am 20. und 21. 2. 1950 wurden die Gefäße zur nunmehr 3. Ansaat hergerichtet. Da unter den bisherigen Bedingungen die *Azotobacter*-Impfung und -Anreicherung Wachstum und Ertrag der Pflanzen nicht günstig beeinflußt hatte, wurde die Wirkung einer Molybdänzugabe in die Versuchsfrage miteinbezogen, falls ein Mangel an diesem für die Stickstoffbindung so wichtigen Element (BORTELS, 1937) *Azotobacter* gehemmt hätte. Und zwar erhielten die Reihen III, IV und V mit Albboden eine Gabe von 0,5 g Natriummolybdat. Eine sonstige Düngung erfolgte vorläufig nicht.—

Die Ansaat am 21. 2. beim Filder- und am 25. 2. beim Albboden erfolgte wiederum mit Senf, um bei etwa eintretenden Fruchtfolgeschäden die *Azotobacter* nachgesagte Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegen pflanzenpathogene Keime beobachten zu können.

Vegetationsbeobachtungen 1950:

Bei der am 26. 2. eintretenden und bis zum 5. 3. anhaltenden Wetterverschlechterung mit Schnee und tiefen Temperaturen erfolgte das Auflaufen nur zögernd, obwohl der Versuch im geschützten, allerdings ungeheizten Glashaus untergebracht war; Unterschiede traten dabei nicht auf. Bis zum 10. 3. machte sich die Wirkung der Molybdändüngung durch eine blaue Verfärbung der Blätter bemerkbar. Am 19. 3. erhielten die Stickstoffreihen eine Gabe von 0,5 g N als NH_4NO_3 (beim Filderboden irrtümlich die Reihe I statt II). Unterschiede zwischen geimpft und ungeimpft wurden nicht beobachtet. Am 23. 3. war bei dem geimpften Gefäß 129 das Auftreten einer Fußkrankheit festzustellen; 12 in Farbe und Wachstum sonst normale Pflanzen zeigten gleich über dem Boden auf einer Strecke von etwa 1 cm eine deutliche Einschnürung und eine Art Verschorfung am Stielchen; infolgedessen waren die Pflänzchen umgefallen. Gegen die übrigen Reihen blieb ungedüngt zurück.

Am 25. 3. war ein geringer Vorsprung der geimpften Töpfe des Albbodens II-Ro, II-Ha, III-Ro und IV-Ro vor den ungeimpften Vergleichsgefäßen sichtbar, der in den nächsten Tagen bei den mit Stickstoff und Molybdän gedüngten Gefäßen zunahm. Besonders die im Vorjahr doppelt mit Phosphorsäure versehene Gefäßgruppe III-Ro zeichnete sich durch kräftigeres Blatt aus und rief dadurch den Eindruck eines viel volleren Bestandes hervor. Dagegen kümmerten die Pflanzen bei den ungeimpften Gefäßen der Reihen III und IV gleichmäßig. — Am 29. 3. machte sich die Wirkung der Stickstoffdüngung bemerkbar. — Am 3. 4. hatte der Vorsprung der geimpften Stickstoff-Molybdän-Gefäße weiter zugenommen. Die doppelt mit P gedüngte Reihe III stand besser als die im Vorjahr doppelt mit N gedüngte Reihe IV (um im Vergleich zur Reihe II beim Albboden die Wirkung des Molybdäns erfassen zu können, wurde in diesem Jahre auf die zusätzliche N-Gabe verzichtet). Auch die abnormale Anthozyanfärbung der Pflanzen war bei der (früheren) NP_2K -Reihe am meisten zurückgegangen, während sie bei den ungedüngten Gefäßen nach wie vor anhielt, verbunden mit Erscheinungen des Kümmerns und Vergilbens. Der bessere Stand der Pflanzen auf III-Ro und IV-Ro war augenscheinlich auf eine Wirkung der *Azotobacter*-Impfung und -Anreicherung zurückzuführen; der Vergleich mit den anderen Düngungsweisen mußte zu dem Schluß führen, daß Molybdän, Phosphorsäure und Stickstoff diese Wirkung fördern, ja anscheinend erst ermöglichen. Dabei war die Blattfarbe der geimpften Pflanzen eher heller als dunkler, ein Befund, der nicht auf eine Stickstoffwirkung von *Azotobacter*

hinwies. Die Gefäße ohne N-Düngung zeigten deutlichen Stickstoffmangel. Die fußkranken Pflanzen im Topf 129 gingen bemerkenswerterweise nicht ein, sondern erholten sich und standen schließlich den anderen Pflanzen in keiner Weise nach.

Der Vorsprung der geimpften, mit Molybdän gedüngten Pflanzen blieb auch in den nächsten Wochen bestehen, nahm aber nicht mehr weiter zu. Am 17. 4. übertrafen III-Ro und IV-Ro die ungeimpften Parallelen im Längenwachstum um 4 cm = 20%. Bei den ungedüngten Gefäßgruppen erholten sich einige Pflanzen, die meisten jedoch kümmerten bis zum Schluß weiter. Auf dem Filderboden waren nirgends merkbare Unterschiede zwischen geimpft und ungeimpft. — Außer bei III-Ro und IV-Ro war auch am 29. 4. kein Unterschied zwischen geimpft und ungeimpft sichtbar, doch schien deren Vorsprung etwas geringer geworden zu sein. Bei der Ernte am 11. 5. waren die Pflanzen auf Filderboden in voller, auf Albboden bei beginnender Blüte.

Die Erträge aller geimpften Düngungsweisen liegen mit Ausnahme von I-Ha beim Filderboden und I-Ro beim Albboden höher als die der ungeimpften (vgl. Tab. 8, S. 74). Mengenmäßig ist der Vorsprung der mit Molybdän gedüngten Gefäßgruppen III-Ro und IV-Ro am größten; der Mehrertrag beträgt hier 3,9 g = 15% (gesichert) bzw. 4,0 g = fast 17% (wegen der hohen Streuung nicht gesichert). Prozentual liegt der Mehrertrag von I-Ha auf Albboden mit 0,8 g = fast 21% (gesichert) am höchsten. Der Minderertrag von I-Ha auf Filderboden beträgt 2,4 g = 10% und ist ebenfalls gesichert. Aus dem Vergleich der Reihen III-U und III-Ro mit II-U und II-Ro auf Albboden geht eine ertragsteigernde Wirkung der Molybdändüngung mit Deutlichkeit hervor.

Beobachtungen über das Verhalten von *Azotobacter* im 2. Versuchsjahr.

Um die Schwierigkeit bei der Bestimmung der *Azotobacter*-Zahlen zu beseitigen, wurden während der Wintermonate, unter Berücksichtigung des Molybdänbedarfs von *Azotobacter*, Versuche mit verschiedenen Nährösungen gemacht. Es zeigte sich, daß von den geprüften Lösungen (BEIJERINCKSche Mannitlösung und ASHBY-Nährlösung, in denen zum Vergleich der Brauchbarkeit anderer Kohlenhydrate Mannit durch Glucose ersetzt wurde) die Mannitnährösung nach ASHBY am besten geeignet war, worauf PETSCHENKO (1930) schon früher aufmerksam machte. Die ASHBY-Nährösung weist einmal den Vorteil auf, daß sie Wachstum von *Azotobacter* makroskopisch durch eine starke Trübung und Kahmhautbildung einwandfrei erkennen läßt, und zum anderen den, daß sie eine Buttersäuregärung stets verhindert. Wie Vorversuche zeigten, war es mit ASHBY-Nährösung + 0,005% Natriummolybdat ohne weiteres möglich, die Verdünnungen in Reagensröhren mit je 5 cm³ Nährösung statt mit 25 cm³ in den bisher benutzten ERLMAYER-Kölbchen durchzuführen, was die Untersuchungen sehr erleichterte.

Die Ergebnisse der Bodenuntersuchungen enthält die Tab. 6. Die *Azotobacter*-Zahlen der geimpften Reihen liegen nach wie vor höher als die der ungeimpften, doch könnte man beim Vergleich der Ergebnisse der

Bodenuntersuchungen aus dem Jahre 1950 mit denen im Vorjahr annehmen, daß die *Azotobacter*-Gehalte während des Winters bei den geimpften Töpfen stark zurückgegangen sind. Zwar zeigen die Ergebnisse nach wie vor einen höheren Gehalt der geimpften Töpfe, aber das Wachstum in den höheren Verdünnungen wie im Vorjahr ist nur in Ausnahmefällen eingetreten.

Wie ein Kontrollversuch zeigt, liegt den neu ermittelten *Azotobacter*-Zahlen jedoch kaum eine Veränderung im Bakteriengehalt des Bodens

Tabelle 6. *Azotobacter im Filder- und Albboden März—Mai 1950.*

2—5 = Verdünnungsstufen (Verdünnungsstufe 1 wurde nicht ausgeführt; 2 = 1 : 100 usw.).

Behandlung und Düngung	Ungeimpft		<i>Az.</i> -Rohkultur		<i>Az.</i> -Handelsimpfstoff		Datum
	Boden-einwaage	Azotob.-Gehalt	Boden-einwaage	Azotob.-Gehalt	Boden-einwaage	Azotob.-Gehalt	
<i>Filderboden</i>							
NPK	5,68	2	9,49	3—4	7,05	2—3(4)	20. 3.
	6,42	2	6,20	2	6,58	2	3. 4.
	5,02	—	6,02	3	5,76	2—3	17. 4.
	5,63	—	6,24	2—3	4,87	2	2. 5.
PK	6,45	2	6,48	3	6,13	2—3	
	6,52	2	7,69	2—3	5,56	2	wie oben
	5,84	—	5,60	2—3	5,93	2	
	5,31	—	5,64	2	6,55	2—3	
<i>Albboden</i>							
PK	5,38	—	6,45	3—4	5,89	2—3	21. 3.
	4,93	—	5,41	2—3	5,24	2—3	4. 4.
	5,23	2	5,37	2—3	4,91	2	18. 4.
	5,17	—	5,94	3—4	5,14	2—3	2. 5.
NPK	6,06	2	5,58	3—4	5,91	2—3	
	5,51	—	5,73	4	5,84	2	wie vorher
	6,57	—	5,82	2—3	4,88	2—3	
	5,27	2	5,37	2	5,23	2—3	
NP ₂ K + Molyb.	5,24	2	4,96	3			21. 3.
	5,35	2	5,03	2—3			4. 4.
	5,64	—	5,33	2—3			18. 4.
N ₂ PK + Molybd.	5,01	2	4,98	3			
	5,08	2	5,34	3			wie vorher
	5,94	—	5,35	2			
unged. + Molybd.	5,38	2			5,21	2—3	
	5,31	2	fehlt		5,59	2	
	5,73	—			5,58	2—3	wie vorher

zugrunde. Vielmehr müssen die Unterschiede auf die Verschiedenartigkeit der benutzten Nährösungen zurückgeführt werden, denn mit BEIJERINCKScher Nährösung wurden auch in diesem Jahre die höheren *Azotobacter*-Zahlen des Vorjahres erhalten. Auch ergaben die Untersuchungen eines neu angelegten Impfversuches, bei dem die gleiche Menge des gleichen Handelsimpfstoffes angewendet wurde, in ASHBY-Nährösung die gleichen Ergebnisse wie die Untersuchungen der geimpften Töpfe des Vorjahres.

Was die Sicherheit der Ergebnisse anbelangt, so findet man auch hier das eigenartige „Überspringen“ einer Verdünnungsstufe. Man könnte annehmen, der Grund hierfür liege in einer mangelnden Sorgfalt beim Anlegen der Kulturen. Dem widerspricht als erstes die Tatsache, daß diese „Sprünge“ niemals größer als eine Verdünnungsstufe sind, also die Abweichungen nie weit außerhalb der Reihe liegen. Weiterhin wurde zur Beantwortung der Frage, inwieweit aus der Luft einfallende *Azotobacter*-Keime Fehler in die Zählung hineinbringen können, folgender Versuch angestellt: Es wurden zweimal zwei Verdünnungsreihen mit je 7 Röhrchen angelegt; 14 Röhrchen wurden wie gewöhnlich mit einem Wattebausch verschlossen, 14 blieben offen.

Mit Wattebausch verschlossen a) *Azotobacter*-Wachstum in Verdünnung von 1 : 100. b) *Azotobacter*-Wachstum in Verdünnung von 1 : 100 und auch noch in einer Parallele 1 : 1000.

Unverschlossen: a) *Azotobacter*-Wachstum in Verdünnung 1 : 100 und auch in beiden Parallelen 1 : 1000. b) *Azotobacter*-Wachstum in Verdünnung 1 : 100.

Die höheren Verdünnungen von 1 : 10000 und 1 : 100000 zeigten nirgends *Azotobacter*-Wachstum, was man als Zeichen dafür nehmen darf, daß eine Verunreinigung durch Luftkeime nicht eingetreten war. Allerdings zeigt auch dieser kleine Versuch Unregelmäßigkeiten ähnlich denen der anderen Untersuchungen.

Der bei den vorjährigen Untersuchungen beobachtete Unterschied zwischen den beiden Impfstoffen zeigte sich auch in ASHBY-Nährösung; in den Röhrchen von mit *Azotobacter*-Rohkultur geimpften Reihen war die Pigmentbildung immer stärker als in den Röhrchen mit *Azotobacter*-Handelsimpfstoff, wo sie bisweilen ganz unterblieb. Statt dessen war das *Azotobacter*-Wachstum in den letztgenannten Kulturen fast stets mit einer hellgrünen Verfärbung der Nährösung verbunden.

Zur Sicherung der Ergebnisse waren in den Wintermonaten ebenfalls Versuche mit der Plattenmethode unternommen worden. Das Platten-gußverfahren lieferte keine brauchbaren Ergebnisse. Die Keime wachsen teils im Agar, teils auf dem Agar, ein Umstand, der die Gleichmäßigkeit des Kolonienwachstums stört und die Zählung erschwert. Das andere Verfahren, eine kleine Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit auf der bereits erstarren Platte auszustreichen (LEHMANN-NEUMANN, 1926), dürfte dagegen gerade für *Azotobacter*-Zählungen geeigneter sein.

PETRI-Schalen, die zur schnelleren Abkühlung und zur Vermeidung der sonst sehr starken Kondenswasserbildung auf einer Glasplatte standen, wurden mit etwa 10 cm³ Mannitagar nach LEHMANN-NEUMANN (1927) beschickt. Um eine Verunreinigung zu vermeiden, wurde darauf verzichtet, die Platten zum Abtrocknen in

den Brutschrank zu stellen. — Die Ausstriche wurden bald nach dem Erstarren des Agars mit 0,1 cm³ der zu untersuchenden Verdünnungskultur nach der Methode von JAKOBSTHAL hergestellt. — Die dabei stets vorhandenen Kontrollen wurden mit 0,1 cm³ steriler Nährösung ausgestrichen und zeigten nie Wachstum von *Azotobacter*-Formen. Sie blieben meist steril, nur selten wurde eine Schimmelpilzinfektion und einmal eine Mikrokokkenkolonie festgestellt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren insofern überraschend, als sich in den meisten Fällen Kolonien mit *Azotobacter*-Formen noch von den Ausstrichen der Verdünnung 1 : 100000 entwickelten, während sich bei den Ausstrichen aus 1 : 10 ein grauer Belag auf den Platten bildete. Weiter bestand bei den Platten aus Verdünnung 1 : 100000 kein Unterschied zwischen geimpft und ungeimpft, wie Tab. 7 zeigt.

Tabelle 7. *Befunde der Ausstrichplattenkulturen.*

Zeichen und Boden	Ausstrich aus Verdünnung	Kulturen		Anzahl der „Azotobacter“-Kolonien		
		angelegt am	beobachtet bis	a	b	c
I—Ro I—U I—Ha	1 : 100000	4. 4.	17. 4.	1	—	—
Filder				1	—	—
II—U II—Ha	1 : 100000	18. 4.	10. 5.	2	4	2
Alb				—	—	—
III—U				2	3	—
I—Ro Filder				1	2	fehlt
I—U Filder	1 : 100000	2. 5.	3. 6.	1	4	fehlt
II—Ha Alb				3	—	fehlt
I—Ro Filder				—	—	fehlt
I—U Filder	1 : 1000000	2. 5.	3. 6.	—	—	fehlt
I—Ha Alb				1	—	fehlt

Daß die Platten die lange Zeit bis zu über 4 Wochen beobachtet werden konnten, lag daran, daß sie nicht im Brutschrank, sondern im Labor aufbewahrt wurden, wo einmal die relative Luftfeuchtigkeit um 20 und mehr Prozent höher war, so daß die Platten nicht so schnell austrockneten, und wo zweitens die sonst oft störenden Schimmelpilze nicht so gut wuchsen. Entgegen der normalen Beobachtungszeit von 4 Tagen wurden die Platten länger aufbewahrt, weil die Kolonien im Vergleich zu normalen *Azotobacter*-Kolonien sehr viel langsamer heranwuchsen. Weiter stellte sich heraus, daß bei einer kürzeren Beobachtungszeit und unter den Bedingungen des Brutschanks einige Organismen anscheinend nicht zur Koloniebildung kommen, die bei Zimmertemperatur und -Luftfeuchtigkeit anwachsen. Schließlich zeigte sich, daß einige Kolonien im Laufe der Zeit ihren Charakter änderten, d. h. daß nach 4 Wochen einige Kolonien sich zu großen Kolonien mit typischen *Azotobacter*-Formen umgewandelt hatten, die bei der ersten Untersuchung nach 5 Tagen ein ganz anderes Aussehen mit anderen Bakterienformen aufwiesen. Nur in wenigen Ausnahmefällen enthielten die später aus *Azotobacter*-Formen bestehenden Kolonien diese Formen schon bei der ersten Untersuchung; fast immer entwickelten sie sich aus Kolonien, die zuerst unregelmäßig geformte

längere oder kürzere Stäbchen oder auch Kurzstäbchen ohne erkennbare Zellmembran enthielten. Beachtenswert ist, daß andere Kolonien gleicher Art ihre Formen nicht wie oben beschrieben, veränderten, sondern bis zuletzt ihr Aussehen beibehielten. Fast ausnahmslos dagegen wiesen die zuerst ganz einheitlichen Kolonien am Ende der Beobachtungszeit morphologisch verschiedene Bakterien auf.

Es erhebt sich nun die Frage, ob es sich bei den beobachteten *Azotobacter*-Formen tatsächlich um *Azotobacter* handelt. Auf Grund der Ergebnisse der Plattenkulturen müßte der *Azotobacter*-Gehalt der Böden etwa bei 1 Million/g Boden liegen, und Unterschiede zwischen geimpft und ungeimpft wären nicht vorhanden, wogegen nach dem Verdünnungsverfahren die geimpften Gefäße nur einige tausend, die ungeimpften höchstens einige hundert *Azotobacter*-Keime bzw. -Kolonien je 1 g Boden enthielten.

Zur Beantwortung dieser Frage sollte zunächst untersucht werden, ob die Flüssigkeitskulturen der Verdünnungsstufe 5 nicht doch *Azotobacter* enthielten, wenn sie auch nicht das starke *Azotobacter*-Wachstum aufwiesen wie die unteren Verdünnungsstufen. Im mikroskopischen Präparat waren jedoch keine typischen *Azotobacter*-Zellen vorhanden, sondern nur vereinzelt *Azotobacter*-ähnliche Organismen, denen stets die *Azotobacter* kennzeichnende körnige Zellstruktur fehlte und die manchmal auch etwas unregelmäßige Formen aufwiesen. Daß aber die Verdünnungen von 1 : 100000 tatsächlich die oben beobachteten *Azotobacter*-Formen enthielten, zeigte sich, wenn man mit der Platinöse eine Spur der Flüssigkeit auf Mannitagar übertrug. Auf dem zuerst grau-wässrigen Schleim des Ausstrichs, der zuerst keine *Azotobacter*-Formen enthielt, begann sich nach etwa 10 Tagen ein grauweißer Überzug zu bilden; zugleich beobachtete man jetzt unter dem Mikroskop die gekörnten Ovale, welche von normalen *Azotobacter*-Zellen nicht zu unterscheiden waren. Das Auftreten dieser Formen setzte nicht in allen Ausstrichen gleichzeitig ein, doch waren nach vier Wochen mehr oder minder zahlreich überall diese *Azotobacter*-Zellen vorhanden, wie wiederholte Untersuchungen aller Kulturen der Verdünnungsstufen 1 : 100000 ergaben. Ausstriche aus Kontrollröhren blieben dagegen stets steril.

Vorausgesetzt, daß es sich bei den beobachteten *Azotobacter*-Formen tatsächlich um *Azotobacter* handelt, müßten nach diesen Ergebnissen die Differenzen zwischen den Befunden des Plattenkultur- und denen des Verdünnungsverfahrens dadurch bedingt sein, daß *Azotobacter* auf Mannitagar günstigere Lebensbedingungen vorfindet als in Mannitnährösung, da nämlich auf den Platten Keime zu Kolonien heranwachsen, die in den Flüssigkeitskulturen versagen. Nach den Erfahrungen von WENZL (1934) und DÜGGELI (1924) ist es jedoch gerade umgekehrt; z. B. befriedigten die Versuche letztergenannten Autors, die Zahl von *Azotobacter* mit Hilfe von Gußkulturen festzustellen, nicht, „da nur ein bescheidener Prozent-

satz jener durch die Verdünnungsmethode in der Nährlösung nachgewiesenen *Azotobacter*-Keime auf dem Agar zur Kolonienbildung schritt“, und es erhebt sich abermals die Frage, ob es sich bei den *Azotobacter*-Formen der Plattenkulturen tatsächlich um dieselben, normalen *Azotobacter*-Organismen handelt, welche in N-freier Nährlösung zur Kahmhautbildung befähigt sind. Für die Übereinstimmung spricht die morphologische Ähnlichkeit der Organismen, wie auch die Beschaffenheit des Kolonienwachstums: Groß, schleimig, grauweiß, körnig, teilweise mit radiären Streifen und etwas bräunlichem Pigment (BREED, 1948; LEHMANN-NEUMANN, 1927). Demgegenüber steht die Tatsache, daß sich die *Azotobacter*-Kolonien der Platten aus Kolonien entwickelt haben, die anfänglich keine *Azotobacter*-Formen enthielten. Beachtenswert ist ferner, daß innerhalb 24 Std starkes Wachstum eintrat, wenn man diese „*Azotobacter*“-Kolonien in Bouillon übertrug, während Bouillon normalerweise ein für *Azotobacter chroococcum* völlig ungeeignetes Medium darstellt, so daß die „Bouillonsterilität“ einer Kultur als Zeichen seiner Reinheit gilt. Allerdings soll auch LÖHNIS zuweilen ansehnliche *Azotobacter*-Entwicklung in Bouillon beobachtet haben, während STAPP und RUSCHMANN (1924) einen solchen Fall nicht feststellten. Zurückübertragen auf Mannitagar, wuchsen im Ausstrich aus den Bouillonröhren wieder die gleichen *Azotobacter*-Formen.

Gegen eine grundsätzliche Verschiedenheit könnte man auch die Unregelmäßigkeiten des *Azotobacter*-Wachstums in den Verdünnungskulturen anführen, das Auftreten der „Sprünge“ und die manchmal schlechte Übereinstimmung im *Azotobacter*-Gehalt gleicher Gefäße und Reihen. Auch bekommt man andere Ergebnisse, wenn man die Verdünnungskulturen nicht im Brutschrank, sondern bei Zimmertemperatur lange genug aufbewahrt. So wurden bei der Bodenuntersuchung am 3. April 1950 von den Reihen II-Ro und II-Ha auf Albboden Parallelen bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Während sich *Azotobacter* im Brutschrank bei der ersten Reihe bis zur Verdünnungsstufe von 1 : 10000 und bei der zweiten bis 1 : 100 durchsetzte, wiesen die bei Zimmertemperatur stehen gelassenen Kulturen am 5. Juni eine *Azotobacter*-Kahmhaut noch bei 1 : 100000 bzw. 1 : 1000 auf.

Dieser Versuch war auf einen Hinweis von LÖHNIS unternommen, der mitteilt, daß tiefe Temperaturen die Bildung sogenannter *Azotobacter*-Regenerativformen fördern. Nach LÖHNIS und SMITH (1916, 1923) soll nämlich *Azotobacter* wie auch andere Bakterien einen sogenannten Lebenszyklus mit verschiedenen Wuchsformen durchlaufen, was aber von LEWIS (1937) entschieden bestritten wird.

Auf Grund der Annahme, daß die LÖHNISSEN Wuchsformen auch im Boden vorkämen, wäre eine Erklärung der eigenen Befunde nicht schwierig. Denn trotz der nach der Verdünnungsmethode eindeutig erwiesenen Unterschiede im *Azotobacter*-Gehalt könnte der Bestand an irgendwelchen

andern *Azotobacter*-Wuchsformen im Boden gleich sein, und die Unregelmäßigkeiten in den Ergebnissen des Verdünnungsverfahrens könnten durch eine aus bisher unbekannten Gründen unregelmäßige Regeneration dieser Wuchsformen zu normalem *Azotobacter* ihre Erklärung finden.

Trotz dieser so naheliegenden Erklärungsmöglichkeit reichen die mitgeteilten Befunde zu einer solchen Stellungnahme nicht aus. Vielmehr stellte sich — was die Ergebnisse der Plattenkulturen angeht — bei weiterer Kultivierung dieser *Azotobacter*-Formen ein eindeutiger Unterschied zu *Azotobacter chroococcum* heraus. War schon das Wachstum der *Azotobacter*-Formen auf den Platten ungewöhnlich langsam, so versagten sie bei Übertragung in flüssige N-freie Medien ganz. Sie wuchsen weder bei der gewöhnlichen Temperatur von 28° C noch bei höheren noch bei tieferen Wärmegraden, weder in Rein- noch in Mischkultur, weder mit Mannit noch mit Glucose noch mit Stärke als Kohlenstoffquelle. Das Einhängen eines Streifens Filterpapier oder die Kultivierung auf Gipsblöcken blieben ebenso erfolglos wie die Zugabe von *Azotobacter*-Filtrat. Die Übertragung einer Öse Bakterienmaterials aus einer *Azotobacter*-Kahmhaut dagegen erzeugte überall *Azotobacter*-Wachstum.

Gleichzeitig mit den Versuchen, diese *Azotobacter*-Formen in flüssigen Medien zur Entwicklung zu bringen, wurde deren Wachstum auf festen Substraten geprüft. Die Organismen wuchsen gut auf Bouillon- und N-haltigem Kartoffelagar, welche nach LÖHNIS die *Azotobacter*-Regeneration fördern sollten und vielleicht auch die Stickstoffbindefähigkeit hätten anregen können. Jedoch blieben noch so häufige Passagen im Wechsel mit N-freiem Mannitagar nach LEHMANN-NEUMANN ohne Erfolg. Das Wachstum auf letztgenanntem Substrat war stets so gering, daß man eine Stickstoffbindung nicht annehmen konnte. Schließlich sei noch erwähnt, daß vier eben dieser von Herrn Dr. BURCIK in die Sammlung des Bot. Instituts übernommenen Stämme nach kurzer Zeit eingingen.

Nun ist aus zahlreichen Untersuchungen bekannt, daß die Stickstoffbindung keine wesentliche Funktion von *Azotobacter* ist; bei Vorhandensein von geeignetem gebundenem N zieht er diesen dem Luftstickstoff vor. Ferner — und das scheint ein besonders wichtiger Punkt bei der Beantwortung der Frage nach der Existenz nichtstickstoffbindender *Azotobacter*-Formen — wird verschiedentlich berichtet, daß *Azotobacter* unter gewissen abnormen Bedingungen seine Fähigkeit zur Bindung des Luftstickstoffs verlieren kann.

STUMBO und GAINAY (1938) stellten in umfangreichen Untersuchungen fest, daß nach 108 tägiger Kultur auf bis zu 4% N-haltigem Substrat 18 von 49 geprüften *Azotobacter*-Stämmen die Fähigkeit zur Bindung des Luftstickstoffs einbüßten. Da jedoch die Angaben darüber fehlen, ob die benutzten *Azotobacter*-Stämme auf Reinheit getestet wurden, scheinen diese Befunde nicht ausreichend, die Existenz nichtstickstoffbindender Stämme zu beweisen, abgesehen von der weiteren Feststellung

der Verfasser, daß diese Stämme unter geeigneten Kulturbedingungen eine wenn auch geringere Stickstoffbindungsfähigkeit wiedererlangten. RIPPEL und FISCHER (1946) beobachteten nach genügend zahlreichen Passagen auf Nitrat-haltigem Substrat eine Depression der N-Bindung, wenn *Azotobacter* auf N-freien Nährböden zurückübertragen wurde. Diese Depression bezog sich jedoch nur auf den zeitlichen Verlauf der N-Bindung, nicht auf die absolute Höhe und verschwand nach spätestens 4 Passagen auf Nährböden ohne Stickstoff. Bei den Untersuchungen von DEN DOOREN DE JONG (1938) über das Verhalten von *Azotobacter* unter abnormen Lebensbedingungen wurde nach Kultivierung auf N-haltigen festen Nährböden keine bleibende Veränderung beobachtet, dagegen verlor nach Kultivierung in flüssigen Medien einer von 6 *Azotobacter*-Stämmen die N-Bindungsfähigkeit. Jedoch ergab es sich, daß einige Kolonien eines Ausstrichs dieser Kultur das Vermögen zur Stickstoffbindung zurückgewinnen konnten.

Für die bei den eigenen Untersuchungen beobachteten *Azotobacter*-ähnlichen Organismen ohne N-Bindung ergibt sich hieraus mit genügender Sicherheit, daß es sich nicht um *Azotobacter chroococcum* handeln kann. Die Beobachtungen geben einen neuen Hinweis für die Schwierigkeit, *Azotobacter* auf Grund seiner morphologischen Eigenschaften zu erkennen. Bei derartigen Befunden scheint es angebracht, die N-Bindungsfähigkeit — vielleicht sogar die Höhe der N-Bindung, für die FISCHER (1950) unter optimalen Bedingungen bei 70 geprüften Stämmen (mit einer Ausnahme) 17,5 mg N/je g Mannit einheitlich feststellte — als eindeutiges Kriterium für *Azotobacter* zu fordern und zwischen *Azotobacter*-Formen und *Azotobacter chroococcum* scharf zu unterscheiden, solange den morphologischen Befunden nicht die entsprechenden physiologischen Beweise gegenüberstehen.

Den Einwand, daß diese Unterscheidung nicht berücksichtigt worden ist, muß man z. B. den Mitteilungen von MALTSCHEWSKY (1948, 1949) über die Anpassungsfähigkeit von *Azotobacter chroococcum* machen. An und für sich würden diese Arbeiten nur eine Vermutung von LÖHNIS bestätigen, daß die verschiedenen *Azotobacter*-Wuchsformen auch durch eine verschiedene physiologische Leistungsfähigkeit ausgezeichnet sind; doch dürften die Behauptungen MALTSCHEWSKYS zu sehr auf morphologische Befunde gestützt sein, um als bewiesen zu gelten. Zum Beispiel beimpfte die Autorin sterilisiertes Kartoffelschalensubstrat mit ihrem *Azotobacter*-Stamm „*Azotobacter Karlsruhe dissoziert*“. Nach einiger Zeit wurde beobachtet, daß die *Azotobacter*-Zellen sich stark verändert hatten und Formen von kleinen, runden oder etwas länglichen kokkenförmigen Zellen annahmen, die eine energische Gärung des Substrats verursachten. Zurückübertragen auf N-freien Mannitagar, zeigte der *Azotobacter*-Stamm schönes Wachstum, was MALTSCHEWSKY als Beweis dafür annimmt, daß der *Azotobacter*-Stamm nach dieser Dissoziation seine Fähigkeit zur N-Bindung nicht verloren hat. Ebenso naheliegend dürfte allerdings die Annahme sein, daß unter den übertragenen Organismen neben den „Dissoziationsformen“ auch unveränderte *Azotobacter*-Zellen vorhanden waren, die ohne Zweifel in der Lage sind, alle „Anpassungsformen“ in kurzer Zeit zu überwuchern. Es sei auch darauf hingewiesen, daß die zur Cellulosezersetzung befähigten Anpassungsformen MALTSCHEWSKYS sich in Flüssigkeitskulturen genau so wenig zur Stickstoffbindung befähigt erwiesen wie die in vorliegender Arbeit beobachteten Umwandlungsformen. Wenn dagegen dieselben Organismen in der ersten Generation auf Platten, auf denen sie zunächst ebenfalls nur eine schwache Entwicklung einer

farblosen Schleimschicht zeigten, im Verlauf des Wachstums doch eine braune Färbung erhielten und nach den mikroskopischen Beobachtungen aus „normalem *Azotobacter*“ bestand, kann das weder als Beweis dafür gelten, daß diese „gelbe Kultur“ aus umgewandeltem *Azotobacter* bestand noch dafür, daß es sich bei den als „normaler *Azotobacter*“ angesprochenen Organismen tatsächlich um *Azotobacter* handelte. Gegen eine solche Beweisführung sprechen sowohl die Beobachtungen MALTSCHEWSKYS über das Versagen dieser Kultur in flüssigem, N-freiem Medium als auch die eigenen Beobachtungen über das Wachstum der „*Azotobacter*-Formen“. Zur letzten Mitteilung der Autorin über *Azotobacter* als Ursache des Obstverderbs sei nur darauf hingewiesen, daß nach ihren Angaben das Wachstum der fraglichen Kultur auf Platten schwach blieb und die stickstoffbindende Fähigkeit durch einen Tropfen Peptonlösung angeregt werden mußte. Nähere Angaben über dieses Stickstoffbindungsvermögen fehlen¹.

Auch die Arbeiten von LÖHNIS lassen bezüglich der Stickstoffbindungsfähigkeit der beobachteten Umwandlungsformen jede nähere Angabe vermissen, was — wie schon die russischen Forscher DIANOWA und WOROSCHILOWA (1931) in einer Arbeit über azotobakterähnliche Bakterien im Boden feststellten —, eine nicht unwichtige Lücke in seinen Ergebnissen darstellt. Ihnen gegenüber erscheint eine gewisse Skepsis gerechtfertigt, solange den zahlreichen (vgl. auch PRAZMOWSKI, 1912 u. JONES, 1913) morphologischen Befunden nicht die entsprechenden physiologischen Beweise gegenüberstehen. Ob man die auch sonst (DÜGGELI, 1924; WENZL, 1934) festzustellenden Unregelmäßigkeiten der kulturellen *Azotobacter*-Zählverfahren in Richtung auf einen Lebenszyklus deuten darf oder aber sie auf methodische Schwierigkeiten zurückführen muß, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Diskussion der Gesamtergebnisse.

Obschon die durch Impfung erzielten Mehrerträge der dritten Ernte zum Teil recht beachtlich waren (Tab. 8), ergibt sich in den Gesamterträgen kein besonders günstiges Bild für *Azotobacter*. Im ganzen gesehen hat die festgestellte Anreicherung des Bodens mit *Azotobacter* aus der Rohkultur einen unbedeutenden, in keinem Fall gesicherten Mehrertrag gebracht, mit *Azotobacter* aus dem Handelsimpfstoff in einigen Fällen ebenfalls einen geringen Mehrertrag, in anderen jedoch einen Minderertrag, der bei Düngung II-Ha auf Filderboden fast 4 g Trockenmasse (entsprechend 10%) ausmachte.

Vergleicht man die Stickstoffaufnahme der geimpften und ungeimpften Reihen miteinander, so stellt man fest, daß die *Azotobacter*-Anreicherung keine bessere Stickstoffversorgung der Pflanzen zur Folge hatte. Auch der recht beachtliche Mehrertrag der geimpften Reihen des Albabodens in der 3. Tracht von durchschnittlich 12,6% läßt sich nicht auf eine höhere Stickstoffaufnahme zurückführen, wie die Ergebnisse der N-Analysen zeigen. Die Impfversuche von ALLISON (1947) zeigen, daß *Azotobacter* auch dann den Pflanzen keinen Stickstoff lieferte, wenn mit der Impfung genügende Mengen stickstoffarmer Pflanzensubstanz in den Boden gebracht wurden.

¹ Bezuglich der — nicht vorhanden gewesenen — Reinheit des von MALTSCHEWSKY zu den beiden ersten Untersuchungen benutzten Stämmen vgl. STOLP und SPEYER (1952).

Tabelle 8. Ernteerträge der 3. Tracht 1950 und Gesamterträge aus 3 Senfernten
in g Trockenmasse; N-Gehalte in mg und %¹

Zeichen und Düngung	Behandlung	3. Ernte g Trockenm.	N-Gehalt		Gesamt- ertrag	Gesamt- N-Gehalt	
			mg	in %		mg	in % ¹
<i>Filderboden</i>							
I—U } PK (1949)	ungeimpft	24,3 ± 0,64	360,9	1,69	38,1 ± 0,96	540,1	1,42
I—Ro } NPK (1950)	Az.-Rohkult.	25,4 ± 2,31	341,6	1,34	39,3 ± 1,21	521,0	1,33
I—Ha }	Az.-Handel	21,9 ± 0,63	340,8	1,57	35,0 ± 0,46	508,9	1,45
II—U } NPK (1949)	ungeimpft	4,0 ± 0,13	57,7	1,36	39,2 ± 0,73	521,7	1,33
II—Ro } PK (1950)	Az.-Rohkult.	4,5 ± 0,21	64,7	1,43	40,4 ± 0,91	517,7	1,28
II—Ha }	Az.-Handel	4,7 ± 0,09	66,6	1,43	35,3 ± 0,53	521,6	1,48
<i>Albboden</i>							
I—U }	ungeimpft	4,0 ± 0,08	55,4	1,38	18,5 ± 0,35	230,7	1,25
I—Ro } PK	Az.-Rohkult.	3,9 ± 0,56	53,4	1,37	15,4 ± 0,54	205,2	1,37
I—Ha }	Az.-Handel	4,8 ± 0,42	69,5	1,43	17,9 ± 0,28	235,4	1,32
II—U }	ungeimpft	20,8 ± 0,74	354,6	1,71	53,8 ± 0,68	820,8	1,53
II—Ro } NPK	Az.-Rohkult.	23,0 ± 0,84	362,5	1,73	55,7 ± 0,88	796,1	1,43
II—Ha }	Az.-Handel	23,0 ± 1,39	374,1	1,63	54,6 ± 1,71	807,6	1,48
III—U }	ungeimpft	25,9 ± 0,48	380,0	1,47	60,7 ± 1,62	843,0	1,39
III—Ro } N ₂ K	Az.-Rohkult.	29,8 ± 0,83	377,2	1,27	62,0 ± 0,39	830,1	1,34
IV—U }	ungeimpft	24,0 ± 1,76	383,8	1,60	68,2 ± 1,94	1090,4	1,60
IV—Ro } N ₂ PK	Az.-Rohkult.	28,0 ± 1,26	387,2	1,38	70,0 ± 1,67	1076,1	1,54
V—U unged.	ungeimpft	3,6 ± 0,36	66,9	1,84	14,2 ± 0,69	240,1	1,69
V—Ha unged.	Az.-Handel	3,7 ± 0,60	74,8	2,05	12,1 ± 0,92	224,4	1,85

¹ Errechneter Prozentgehalt nach Zusammenziehung der 3 Ernten.

Die Ergebnisse der zuletzt angeführten Versuche sowie die Ergebnisse der eigenen Arbeit werfen die Frage auf, ob *Azotobacter* unter normalen Verhältnissen überhaupt am Stickstoffhaushalt des Bodens beteiligt ist. De' Rossi (1932) bemerkt, daß *Azotobacter* im Boden im Vergleich zu den anderen Organismen zahlenmäßig auffallend wenig vorhanden ist, und glaubt, daß die Bindung des Luftstickstoffs keine wesentliche Funktion von *Azotobacter* ist, da sie nur beim Fehlen verwertbarer Stickstoffformen auftritt. WAKSMAN (1930) weist außerdem darauf hin, daß *Azotobacter* in zahlreichen Böden überhaupt nicht enthalten ist, und vertritt die Ansicht, daß der häufiger und zahlreicher anzutreffende *Bacillus amylobacter* wahrscheinlich für den Stickstoffhaushalt wichtiger ist. WAKSMAN schreibt [zitiert nach WINOGRADSKY (1935)]: „Jedoch eines ist bis jetzt noch nicht festgestellt worden, und zwar, ob diese Organismen

(*Azotobacter*) unter Feldbedingungen wirklich Stickstoff im Boden binden. Das ist ferner durch die Tatsache betont worden, daß die dem Boden zugeführte Energie nicht in Form von Mannit und Dextrose, die beim Studium der Reinkulturen gebraucht werden . . . zugeführt wird, sondern als Cellulose und andere zusammengesetzte Kohlehydrate, die von den Organismen ganz und gar nicht als Energiequelle gebraucht werden können.“

Vieleicht wären die russischen Versuche mit *Azotobacter* geeignet, eine Stickstoffbindung unter den von LÖHNIS geforderten Bedingungen zu beweisen. Leider sind die entsprechenden Arbeiten nicht zugänglich, doch muß bemerkt werden, daß auch die Meinung der russischen Forscher über die Art der *Azotobacter*-Wirkung auseinandergehen. ALLISON (1947) schreibt nach eingehendem Studium sowohl der russischen als auch der übrigen *Azotobacter*-Literatur über die Stickstoffsammlung:

„Vom heutigen Standpunkt unseres Wissens kann diese Erklärung fallen gelassen oder mindestens als unbedeutend abgetan werden. Diese grundsätzliche Behauptung gründet sich auf verschiedene Tatsachen: a) Niemand hat bisher gezeigt, daß *Azotobacter* in der Rhizosphäre gedeiht oder nach einer Impfung in genügender Anzahl vorhanden ist, um merklich Stickstoff zu binden. — b) Es gibt wenig oder überhaupt keine Beweise, daß die Wurzelsekrete groß genug sind, Energie zu liefern für mehr als Spuren einer Stickstoffbindung. — c) Sind Ernterückstände vorhanden, sind diese Energiequellen meist nicht für *Azotobacter* ausnutzbar und werden erst zugänglich, wenn sie durch andere Organismen angegriffen werden, die die meiste Energie selbst verbrauchen. — d) Nach verschiedenen russischen Forschern haben auch andere, nicht stickstoffbindende Bakterien oder sogar deren Filtrate fördernde Wirkungen ähnlich denen, die *Azotobacter* zugeschrieben werden. — e) Einige Forscher berichten schließlich, daß ebenfalls Mehrerträge erzielt wurden, wenn reichlich aufnehmbarer Stickstoff vorhanden war.“

Wenn *Azotobacter* das Pflanzenwachstum durch Wuchsstoffe fördert, (was ALLISON für wahrscheinlich hält), wäre die Annahme berechtigt, daß damit zugleich eine Erhöhung der Widerstandskraft der Pflanzen gegen schädliche Einflüsse verbunden ist. Die eigenen Versuche gaben allerdings keine Anhaltspunkte dafür, ebenso auch nicht dafür, daß *Azotobacter* den Pflanzen bei der Aufschließung von Nährstoffen behilflich ist.

Wenn die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen auch keine grundsätzliche Antwort auf die Frage geben, ob sich die Fähigkeiten von *Azotobacter* in der Praxis ausnutzen lassen, so scheinen die vorliegenden Beobachtungen wenigstens teilweise recht aufschlußreich. Wie bereits festgestellt, lassen sich die Mehrerträge in der 3. Tracht nicht auf eine bessere Stickstoffversorgung der Pflanzen zurückführen. Vielmehr führen die Vegetationsbeobachtungen, die Ernteergebnisse und die N-Analysen zu dem Schluß, daß *Azotobacter* das Pflanzenwachstum durch Wuchsstoffe begünstigt hat. Außerdem erscheint die Feststellung wichtig, daß diese Stimulation erst in der 3. Tracht aufgetreten ist. Will man nämlich nicht

annehmen, daß die in dieser Tracht festgestellte Stimulation ein reines Zufallsergebnis ist — was die (später mitzuteilenden) Ergebnisse der 4. und 5. Tracht widerlegen —, so muß man aus vorliegendem Befunde schließen, daß die bei der Impfung eingebrachten Keime eine längere Zeit benötigt haben, sich den Lebensbedingungen im Boden neu anzupassen.

Bezüglich der Unsicherheit und des Versagens von *Azotobacter* bei einer gewöhnlichen Samenimpfung ergibt sich aus diesen beiden Feststellungen folgendes zur Versuchstätigkeit auf diesem Gebiet: 1. Das Versagen einer *Azotobacter*-Impfung kann im Einzelfalle dadurch bedingt sein, daß die Versuchsbedingungen einseitig auf die sehr zweifelhafte Stickstoffwirkung abgestimmt sind; 2. selbst wenn sich *Azotobacter* durch Samenimpfung in der Rhizosphäre anreichern läßt, kann ein Versagen im Versuch darauf beruhen, daß den unter Laboratoriumsbedingungen aufgewachsenen Organismen die Zeit fehlt, sich den Verhältnissen im Boden genügend anzupassen.

Es dürfte berechtigt sein, den Begriff dieser „Anpassung“ vorläufig noch möglichst weit zu fassen, bis weitere Untersuchungen darüber Klarheit schaffen, worauf es am meisten ankommt. Neben der ernährungs-mäßigen Umstellung von der üppigen 2%o-Mannitquelle auf die im Boden nur spärlich vorhandenen leicht zersetzbaren Kohlenhydrate wäre vor allem an den Einfluß der im Boden vorgefundenen Organismengesellschaften zu denken, die dem eindringenden *Azotobacter* teilweise als Konkurrenten gegenüberstehen. Schließlich müßte auch das individuelle Aufeinander-abgestimmtheit von *Azotobacter*-Stamm und höherer Pflanze miteinbe- schlossen werden, das z. B. POSCHENRIEDER (1949) für sehr wichtig hält und das sich vielleicht erst im Laufe der Zeit einspielt. Allerdings muß bemerkt werden, daß die Fortführung der Versuche, über deren Ergeb-nisse später berichtet werden soll, für die letzte Annahme keine Anhalts-punkte lieferte.

Weiter geben die vorliegenden Ergebnisse einen wichtigen Hinweis für die Beurteilung einer solchen Stimulationswirkung nach dem Augenschein. Wie im Vegetationsbericht bemerkt, wiesen die mit Molybdän und Stickstoff versehenen geimpften Gefäße der Reihen III und IV in den ersten 6 Wochen einen besonders deutlichen Vorsprung auf, der durch kräftigeren und volleren Pflanzenbestand gekennzeichnet war. Später jedoch holten die ungeimpften Reihen diesen anfänglichen Vor-sprung zum großen Teil wieder auf, und die tatsächlichen Mehrerträge blieben hinter den anfangs erwarteten weit zurück. Die Wuchstoffwir-kung hat sich also mehr in einer Beschleunigung des Pflanzenwachstums im Anfangsstadium geäußert als in einer Erhöhung des Endertrages, was auch LESCH u. SAMMET (1949) beobachteten. Aus diesen Feststel-lungen kann man schließen, daß man den Nutzen einer Impfung leicht überschätzt, wenn man nur nach dem Augenschein urteilt (HILTNER 1921).

Zusammenfassung.

Durch Bodenimpfung mit einer gewöhnlichen *Azotobacter*-Rohkultur und einem *Azotobacter*-Handelsimpfstoff gelang es, den *Azotobacter*-Gehalt zweier Böden im Gefäßversuch um etwa das 10—100fache zu erhöhen. Diese Anreicherung blieb während der ganzen Dauer des Versuchs bestehen, wie durch die *Azotobacter*-Zählungen nach dem Verdünnungskulturverfahren nachgewiesen wurde.

Der Einfluß dieser *Azotobacter*-Anreicherung auf die Erträge war verschieden; während die Ernteerträge von SENF (Grünmasse) in der 1. und 2. Tracht nicht erhöht wurden — es zeigte sich sogar deutlich die Tendenz zu einer Ertragsdepression —, wiesen die Ergebnisse der 3. Tracht einen positiven Einfluß der *Azotobacter*-Anreicherung auf, besonders beim Alboden, bei dem die durchschnittliche Ertragserhöhung 12,6% betrug. Der Mehrertrag war in zwei Fällen statistisch gesichert.

Aus der gleich gebliebenen Stickstoffaufnahme ist zu schließen, daß diese Ertragserhöhung nicht auf einer Stickstoffbindung, sondern auf einer sogenannten Stimulations-(Wuchsstoff-)wirkung von *Azotobacter* beruhte. Nach den Vegetationsbeobachtungen und den Ernteergebnissen wurde diese Wirkung durch Molybdän, Phosphorsäure und Stickstoff unterstützt.

Aus der Wirkungslosigkeit der *Azotobacter*-Anreicherung im Boden bezüglich der Erhöhung der Pflanzenerträge in der 1. und 2. Tracht und aus dem Auftreten der Stimulation erst zur 3. Tracht wird geschlossen, daß die dem Boden zugefügten Keime vor dem Wirksamwerden ein Anpassungsstadium durchmachten. Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, daß bei gewöhnlichen *Azotobacter*-Impfversuchen das Fehlen der Zeit, diese Anpassung zu vollziehen, sowie die einseitige Ausrichtung der Versuchsbedingungen auf die recht fragliche Stickstoffwirkung Ursache des „Versagens“ von *Azotobacter* sein können.

Der geringen Ertragserhöhung durch *Azotobacter* stand eine Zunahme der Erträge durch die Gabe von 0,5g Stickstoff je Gefäß von ca. 500% gegenüber.

Über den Einfluß der Düngung und des Pflanzenwachstums auf den *Azotobacter*-Bestand im Boden konnte nichts Sichereres ausgesagt werden, da vorläufig noch ungeklärte Unregelmäßigkeiten bei der Feststellung des *Azotobacter*-Gehaltes nach dem Verdünnungsverfahren die Genauigkeit der Ergebnisse beeinträchtigen. Bei Versuchen, diese Ergebnisse nach dem Plattenkulturverfahren zu kontrollieren, wurde die Entwicklung von Organismen beobachtet, die *Azotobacter* sehr ähnlich sind. Deren weitere Kultivierung zeigte jedoch, daß diese von *Azotobacter* morphologisch nicht zu trennenden Organismen sich durch mangelnde N-Bindung eindeutig von *Azotobacter chroococcum* unterschieden.

Für die Ermöglichung der vorliegenden Arbeit und die Hilfe bei der Durchsicht des Manuskripts ist der Verfasser Herrn Prof. Dr. K. MAIWALD, dem Direktor des Instituts, zu Dank verpflichtet, für manche wertvolle Anregung Herrn Doz. Dr. H. KICK.

Literatur.

ALLISON, F. E.: *Soil Sci.* **64**, 413 (1947). — ALLISON, F. E., V. L. GADDY, L. A. PINCK, and ARMIGER, W. H.: *Soil Sci.* **64**, 489 (1947). — BEIJERINCK, M. W.: *Archives Néerlandaises*, sér. II. Progr. pour l'année S. XXIL, 1904; zit. nach LÖHNIS (1909). — BEREZOWA, E. F., A. N. NAUMOVA and E. A. RASNICINA: *Comt. Rend. Acad. Sci. (USSR)* **18**, 357 (1938); zit. nach ALLISON (1947). — BORTELS, H.: *Cbl. Bakt. II* **95**, 193 (1936); *Arch. f. Mikrobiol.* **8**, 1 (1937). BREED, R. S., E. G. D. MURRAY, and A. P. HITCHENS: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore 1948. — DEN DOOREN DE JONG, L. E.: *Arch. f. Mikrobiol.* **9**, 223 (1938). — DIANOWA, E. W., u. A. A. WOROSCHILOWA: *Cbl. Bakt. II* **84**, 433 (1931). — DÜGGELI, M.: *Landw. Jahrb. d. Schweiz* **38**, 203 (1924). — ENGEL, H.: *Z. Pflanzenern. Düng. u. Bodenk. A* **21**, 32 (1931). — FEDEROW, M. V., and E. S. TEPPER: *Moskow, Ordina Lenina Selsk. Acad. K. A. Timiriazeva. Dok.* **1**, 61 (1945); zit. nach ALLISON (1947). — FISCHER, W. K.: *Arch. f. Mikrobiol.* **14**, 353 (1950). — HALL, A. D.: *The book of Rothamsted experiments, 1905*; zit. nach LÖHNIS **31** (1909). — HILTNER, L., u. K. STÖRMER: *Arb. a. d. Biol. Abt. Kais. Ges. Amt.* **3**, 445 (1903). — HILTNER, L.: *Mitt. d. DLG* **30**, 199 (1915); — **36**, 243 (1921). — JAKOBSTHAL: *Z. Hyg.* **101**. — JONES, D. H.: *Cbl. Bakt. II* **38**, 14 (1913). — KAS, V.: *Vestnik esl. acad. zemed. Prag* **5**, 861 (1929); *Ref. Z. f. Pflanzenern.*, Düng. u. Bodenk. A **16**, 373 (1930). — KONRICH, F.: *Die bakterielle Keimtötung durch Wärme*. Stuttgart 1938. — KOSTYTSCHEW, F., u. A. SHELOUMOW: *Hoppe-Seyler's Z. f. physiolog. Chemie* **198**, 105 (1931). — KRONBERGER, M.: *Landw. Jahrb. f. Bayern* **26**, H. 3/4 (1949). — KÜHN, J.: *Fühling's Landw. Zeit.* **50**, 2 (1901). — LEHMANN, K. B., u. R. O. NEUMANN: *Bakteriologische Diagnostik*. Band I, München 1926; Band II, München 1927. — LESCH, W.: *Z. Pflanzenern., Düng. u. Bodenk.* **47**, 231 (1949). — LEWIS, J. M.: *J. Bacteriol.* **34**, 191 (1937); *ref. Cbl. Bakt. II* **98**, 171. — LÖHNIS, F.: *Fühling's Landw. Zeit.* **58**, 425 (1909). — *Studies upon the life cycles of the bacteria. I. Mem. Natl. Acad. Sci.* **16**, No. 2, 39 (1921). — *Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie*. Band II Teil 2: H. GLATHE. *Bodenbakteriologie*. Berlin 1935. — LÖHNIS, F., u. N. R. SMITH: *J. Agr. Res.* **6**, 275 (1916). — *J. Agr. Res.* **23**, 401 (1923). — MALTSCHEWSKY, N.: *Z. Pflanzenern., Düng. u. Bodenk.* **42**, 241 (1948); — **43**, 254 (1948); **47**, 249 (1949). — PETSCHENKO, B. VON: *Cbl. Bakt. II* **80**, 161 (1930). — POSCHENRIEDER, H.: *Cbl. Bakt. II* **79**, 222 (1929); **80**, 369 (1930). — *Landw. Jahrb. f. Bayern* **26**, 30 (1949). — PRAZMOWSKI, A.: *Cbl. Bakt. II* **33**, 292 (1912). — REMY TH.: *Cbl. Bakt. II* **22**, 561 (1909). — RIPPEL, A.: *J. f. Landw.* **72**, 17 (1924). — *Arch. f. Mikrobiol.* **7**, 210 (1936). — RIPPEL, A., u. W. K. FISCHER: *Nachr. Akadem. Wiss. Göttingen. Math.-Phys. Kl., Biol. Abt. S. I* (1946). — DE'ROSSI, G.: *Soc. Internat. Mikrob. Bolet. Scz. Ital.* **4**, 418 (1932); *Ref. Z. Pflanzenern.*, Düng. u. Bodenk. A **32**, 378 (1932). — SCHMIDT, O. C.: *Z. Pflanzenern., Düng. u. Bodenk.* **40**, 40 (1948); **42**, 149 (1948); **48**, 135 (1949). — SHELOUMOVA, A., u. O. PROTO'D'JAKONOW: *Arb. allrus. Instit. landw. Mikrobiol.* **5**, 119 (1933); *Ref. Z. Pflanzenern.*, Düng. u. Bodenk. A **44**, 377 (1936). — SMITH, N. R., and S. WORDEN: *J. Agr. Res.* **31**, 501 (1925). — STAPP, C., u. G. RUSCHMANN: *Arb. a. d. Biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstwirtsch.* **13**, 305 (1924). — STARC, A.: *Arch. f. Mikrobiol.* **18**, 164 (1943). — STOLP, H., u. E. SPEYER: *Arch. f. Mikrobiol.* **17**, 30 (1952). — STUMBO, C. R., and P. L. GAINAY: *J. Agr. Res.* **57**, 217 (1938). — WAKSMAN, S. A.: *Principles of Soil Microbiology*. Baltimore 1927; *Der gegenwärtige Stand der Bodenmikrobiologie und ihre Anwendung auf Bodenfruchtbarkeit und Pflanzenwachstum*. Fortschr. naturwiss. Forsch. Heft 10 (1930). — WENZL, H.: *Cbl. Bakt. II* **90**, 289 (1934). — WINOGRADSKY, S.: *Soil Sci.* **40**, 59 (1935).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität München.)

Beiträge zur Kenntnis der Physiologie von Azotobacter.

I. Mitteilung.

Von

FRANZ BUKATSCH und JOHANN HEITZER.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. Juni 1951.)

Die nachstehenden Untersuchungen befassen sich mit der Frage, ob die in der Rhizosphäre (im Sinne HILTNERS) auftretenden *Azotobacter*-Formen (*A.*) deutliche physiologische Beziehungen zur benachbarten höheren Pflanze erkennen lassen. Es ist noch nicht einwandfrei gezeigt, ob es an bestimmte Kulturpflanzen angepaßte *A.*-Rassen gibt — ein für das Impfproblem wesentlicher Umstand. KRONBERGER (a) weist mit Recht darauf hin, daß die so unterschiedlichen Ergebnisse bei Impfversuchen an Nutzpflanzen auf die wahllose Anwendung nicht angepaßter *A.*-Stämme zurückgehen können. Er versuchte auch schon in einer weiteren Arbeit (b), die physiologischen Eigenschaften verschiedener *A.*-Rassen gegeneinander abzugrenzen. Allerdings verwendete er für seine Untersuchungen großenteils Bakterienstämme von Handelspräparaten, deren Reinheit und Herkunft nicht genau feststand.

Unsere Untersuchungen gingen dagegen davon aus, *A.* von Wurzeln botanisch genau bestimmter Pflanzen in Reinkultur zu isolieren. Mit diesem einheitlichen und gut definierten Ausgangsmaterial wurden Versuche über Stoffwechselunterschiede zur Abgrenzung bestimmter Rassen angestellt und Wechselbeziehungen zwischen diesen Rhizosphärenorganismen und der höheren Pflanze zu erfassen gesucht.

POSCHENRIEDER (a) fand *Azotobacter* in der Wurzelnähe vieler wildwachsender und gärtnerisch genutzter Pflanzen in Übereinstimmung mit Befunden BEIJERINCKS angereichert, aber vorwiegend nur in der Hauptvegetationsperiode, während im Herbst die Zahl der freilebenden Stickstoffbinder stark absank. Bei 31 Familien konnte er die Anwesenheit von *A.* in der Wurzelregion feststellen, bei 3 Familien aber nicht (*Pinaceen*, *Betulaceen*, *Fagaceen*).

Auch wir konnten diesbezügliche Unterschiede finden: während schon im Frühjahr (Februar—April) bei Klee (*Trifolium pratense*), Rispengras (*Poa pratensis*), Roggen (*Secale cereale*), Mais (*Zea Mays*), Salat (*Lactuca sativa*), Rübe (*Beta vulgaris*), Sonnenblume (*Helianthus annuus*), Petersilie (*Petroselinum sativum*), Erbse (*Pisum sativum*) und Taubnessel (*Lamium album*) von den frisch entnommenen, gründlich mit Leitungswasser gespülten Wurzeln durch Auslegen auf Mannitagar und eine

14tägige Bebrütung bei 30° C leicht Rohkulturen zu gewinnen waren, ergaben Wurzelproben von Ackerschachtelhalm (*Equisetum arvense*), Wurmfarn (*Dryopteris filix mas*), scharfem Hahnenfuß (*Ranunculus acer*), Sumpfdotterblume (*Caltha palustris*), Pfingstrose (*Paeonia officinalis*), Schnittlauch (*Allium Schoenoprasum*), Brunnenkresse (*Roripa amphibium*), Pechnelke (*Viscaria vulgaris*), Maiglöckchen (*Convallaria majalis*) u. a. zu verschiedenen Jahreszeiten unter den oben genannten Bedingungen vorwiegend negative Resultate. Besonders vom Schöllkraut (*Chelidonium majus*) scheinen Hemmstoffe ausgeschieden zu werden, da *A.* auch in der weiter entfernten Rhizosphäre nicht gefunden wurde; diese Art „antibiotischer“ Wirkung soll Gegenstand unserer weiteren Untersuchungen sein.

1. Methode der Reinzucht und Weiterkultur.

Als Nährboden diente in Abänderung der Vorschrift von DZIERZBICKI folgende Zusammensetzung in 1 l Leitungswasser: 20 g Agar; 20 g Glucose; 0,5 g sek. Kaliumphosphat; 0,05 g Magnesiumsulfat; 2 g Schlemmkreide; 2 cm³ Erdabkochung. Bei Stickstoff- und Kohlenstoff-Bilanzversuchen trat an Stelle der Erdabkochung ein Zusatz von 1 cm³ Hoagland AZ-Lösung.

Flüssigkeitskulturen wurden mit der Nährlösung nach GERLACH und VOGEL durchgeführt: 2% Glucose, je 0,05% KH₂PO₄, CaCO₃, NaCl und Spur Fe₂(SO₄)₃. Die Reinkultur erfolgte nach dem KOCHSchen Plattenverfahren. Die isolierten *A.*-Stämme wurden während 1½ Jahren alle 4 Wochen überimpft und auf Wuchsform, Wachstumsgeschwindigkeit, Schleim- und Farbstoffbildung sowie Zellform, Zellgröße und Beweglichkeit ständig überprüft.

Unabhängig von der später genauer zu behandelnden physiologischen Aktivität der Stämme erwies sich die Wuchsfreudigkeit recht unterschiedlich; meist hing diese mit der Schleimproduktion direkt zusammen. Die schnellwüchsigen *A.*-Kulturen von Erbse, Petersilie, Klee, Taubnessel und Roggen bildeten viel mehr Schleim als die langsam wachsenden von Salat, Rübe und Sonnenblume abgezüchteten Rassen.

Auch in der Farbstoffbildung ergaben sich erhebliche Unterschiede: Rispengras-, Korn-, Klee-, Sonnenblumen- und Rübenstamm wuchsen hellbraun. Tiefer Farbtöne zeigten Taubnessel-, Zwiebel- und Salatstamm; die von Petersilie, Mais und Erbsen gewonnenen Formen wuchsen grau.

Im allgemeinen trat keine über die BROWNSCHE Molekularbewegung hinausgehende Zellbeweglichkeit auf; nur in 3 Fällen (Erbsen-, Klee- und Rispengrasstamm) war sie vorhanden und konnte durch Geißelfärbung nach LÖFFLER erhärtet werden. In älteren Kulturen ging die Begeißelung auch in diesen Fällen verloren.

Die Zellen lagen einzeln oder in Paaren, selten in Paketen, waren meist rundlich und etwa 3—4,5 μ groß; ausgesprochen klein waren die Formen

von Klee und Taubnessel (etwa $2\text{ }\mu$), groß dagegen die Zellen des Rispengras- und Erbsenstammes mit $6-7\text{ }\mu$. Die Schleimhülle trat als stark glänzende Membran hervor. Der Rispengrasstamm zeigte Kurzstäbchenform.

2. Einfluß von Peptonzusatz auf das Wachstum.

Nach BERGEY kann nur *A. agilis* in Gegenwart von 0,5% Pepton wachsen, *A. chroococcum* wird gehemmt. Da damit ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal gegeben erscheint, wurde das Wachstum nach 8 Tagen Kultur bei 30° auf Mannitagar mit 0,1 und 0,5% Peptonzusatz geprüft. 0,5% Pepton vertrug nur der Sonnenblumenstamm; Erbsen-, Rispengras-, Roggen- und Kleestamm vertrugen noch gut 0,1%, dagegen wurde *A. von Zwiebel*, Taubnessel, Rübe, Salat, Petersilie und Mais durch Pepton völlig gehemmt. Somit kann nur der Sonnenblumenstamm, der übrigens auch die für *A. agilis* kennzeichnende geringe Farbstoffbildung zeigt, möglicherweise zur Spezies „*agilis*“ gezählt werden.

3. Die Atmungs- und Dehydrasenaktivität der Stämme.

Zur Messung der Atmungsaktivität wurde von jedem Stamm der Inhalt von 6 Schrägröhrchen nach 4 Tagen Kultur in Phosphatpuffer ($\text{pH} = 6,8$) abgeschwemmt zur gleichmäßigen Suspension kräftig geschüttelt und in der Zentrifuge wiederholt substratfrei gewaschen. Die Zellen wurden zur Atmungsbestimmung im WARBURG-Apparat in Phosphatpuffer suspendiert, dem als Atmungssubstrat 2% Glucose zugesetzt waren. Je 2 Proben mit je 3 cm^3 dieser dickflüssigen Suspension wurden bei 28° C viertelstündlich auf ihren O_2 -Verbrauch geprüft.

Nach 2 Std wurde der Körbcheninhalt quantitativ 3 mal in der Zentrifuge zur Befreiung von Glucose- und Stoffwechselresten gewaschen und das Trockengewicht der Zellen als Bezugsgröße ermittelt. Tab. I gibt den O_2 -Verbrauch der Stämme pro Stunde und mg Trockengewicht im Mittel von je 2 Parallelen (I) wieder, eine Wiederholung des Versuches nach 6 Wochen ergab ganz ähnliche Werte (II).

Tabelle I. Atmungsintensität der einzelnen Stämme. *Azotobacter*.

<i>Az.-Stamm</i>	I	II
Klee	861,63	836,39
Rispengras . . .	909,90	872,27
Roggen	532,16	565,96
Rübe	511,75	545,65
Taubnessel . . .	399,72	427,49
Zwiebel	326,43	372,09
Mais	372,16	380,51
Salat	290,81	275,77
Petersilie	244,18	251,53
Erbse	214,89	198,56
Sonnenblume . . .	93,96	109,18

Die Unterschiede zwischen den Stämmen treten scharf hervor: Zwischen den atmungsaktivsten Klee- und Rispengrasstämmen und dem Sonnenblumenstamm mit geringstem O_2 -Verbrauch besteht ein Verhältnis von 9—10 : 1; die anderen Formen halten sich mehr in der Mitte bei

deutlich ausgeprägter Abstufung. KRONBERGER maß in den eingangs erwähnten Versuchen (b) die in einer Woche durch Carboxylasewirkung aus dem Substrat abgespaltene CO_2 -Menge im EINHORN-Kölbchen; auch diese, allerdings nicht ganz quantitative Methode ließ starke Unterschiede in der Kohlenhydrat-Spaltung seiner Stämme erkennen.

Die Reduktionskraft (Dehydraseaktivität) unserer Stämme wurde an Aufschwemmungen in Phosphatpuffer geprüft, die ähnlich wie in den oben beschriebenen Atmungsversuchen erhalten wurden, aber zur Entfernung der körpereigenen Reservestoffe noch 4 Tage in Phosphatpuffer gehungert hatten und dann abzentrifugiert wurden. Je 3 cm^3 dicker Bakteriensuspension wurden mit 3 cm^3 2% Glucoselösung und Phosphatpuffer ($\text{pH} = 6,8$) und $0,2 \text{ cm}^3$ 0,5% Methylenblau (MB)-Lösung versetzt, in Reagenzgläser abgefüllt und entsprechend der Anaerobenkultur ein Wattebausch nachgeführt, darüber ein mit Pyrogallol- und KOH-Lösung getränkter Wattepropf und mit Gummistopfen verschlossen. So konnte gebildetes Leuco-MB nicht durch Luftsauerstoff autoxydiert werden. Die Versuchszeit begann mit dem Augenblick des MB-Zusatzes.

Nach 6stündiger Beobachtung bei konst. Temperatur (32°) wurden die Versuchsreihen abgebrochen; nach 3 Std setzte beim Roggenstamm deutlich Farbstoffreduktion ein mit einem Übergang in graue Tönung, nach 4 Std war das Ausbleichen auch beim Klee-, Rispengras- und Rübenstamm sichtbar und nach 5 Std beendet. Die Ansätze mit *A. von Taubnessel*, Zwiebel und Mais zeigten am Ende eine Entfärbung im unteren Teil der Röhrchen, während Erbsen-, Sonnenblumen- und Salatstamm auch nach 6 Std kaum eine Aufhellung des MB erkennen ließen. Im allgemeinen — doch nicht ganz vollständig — ergibt sich die gleiche Reihenfolge wie beim O_2 -Verbrauch: Atmungs- und Dehydraseaktivität entsprechen einander weitgehend.

4. Katalasebestimmung.

Wenn auch der Katalase im allgemeinen KH-Abbauschema nicht die Bedeutung der Dehydrasen zukommt, waren bei einem so ausgeprägt aeroben Organismus wie *A.* doch Katalaseuntersuchungen wünschenswert, die durch Zugabe von 10 cm^3 einer 2% H_2O_2 -Lösung zu 3 cm^3 wäßriger Bakteriensuspension und Rücktitration des nach 1 Std noch unzersetzten H_2O_2 mit n/10 KMnO_4 in schwefelsaurer Lösung erfolgten.

Stärkste H_2O_2 -Spaltung wiesen Salat-, Taubnessel- und Maisstamm (mit 2,7, 3,7 und 4,9)¹ auf; es folgen Sonnenblumen- (6,4), Zwiebel- (7,9), Petersilien- (9,1), Rüben- (12,1), dann der Erbsen- (13,6) und Roggenstamm (14,9). Als besonders katalasearm können der Rispengras- (17,0) und der Kleestamm (18,6) gelten, so daß wir hier keinen direkten Zusammenhang, eher vielleicht eine gewisse Gegensätzlichkeit zwischen Dehydrasen- und Katalasewirksamkeit feststellen können.

¹ Die eingeklammerten Zahlen bedeuten die zur Rücktitration notwendigen cm^3 n/10 KMnO_4 .

5. Salzresistenz und Reaktionsansprüche.

Hatten die geschilderten Stoffwechselversuche schon eine deutliche Verschiedenheit der Stämme ergeben, so bot die Untersuchung der Ionentoleranz (Cl^- u. Na^+ , bzw. H^+) weitere Unterscheidungsmöglichkeiten. Als obere Verträglichkeitsgrenze an Kochsalz gilt für marinen *A.* nach KEUTNER 8%, für Landformen etwa die Hälfte (STAPP u. RUSCHMANN (a) u. a.). Wir untersuchten Ausstriche unserer Formen in PETRI-Schalen auf Mannitagar mit 1—7% NaCl-Zusatz nach 8 Tagen Bruttodauer bei 30°. Tab. 2 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 2. Salzresistenz der einzelnen *Azotobacter*-Stämme.

Az.-Stamm	NaCl-Konzentration			
	1 %	3 %	5 %	7 %
Klee	+++	—	—	—
Rispengras	+++	—	—	—
Roggen	+++	+	+	—
Rübe	+++	+	—	—
Taubnessel	+++	+	—	—
Zwiebel	+++	+	—	—
Mais	+++	+	—	—
Salat	+++	—	—	—
Petersilie	+++	+	—	—
Erbse	+++	+	+	—
Sonnenblume	+++	+	—	—

+++ optimales, + gutes, — mäßiges, —— schlechtes, —— kein Wachstum.

Bei 7% NaCl, also wesentlich höher als für Landformen bisher bekannt, wuchsen noch Roggen-, Mais-, Petersilien- und Erbsenstamm, allerdings schlecht; Erbsen- und Roggenformen gediehen bei 5% NaCl noch recht gut.

Nach den bisher vorliegenden Literaturangaben liegt die untere Wuchsgrenze von *A.* bei pH 5,8, wobei *A. agilis* säuretoleranter sein soll als *A. chroococcum*; das Optimum erstreckt sich von pH 7—8 [STAPP u. RUSCHMANN (b), POSCHENRIEDER (a), NIKLAS u. POSCHENRIEDER]. Für unsere Vergleiche wurden Ausstriche auf phosphatgepuffertem Agar (pH-Wert nach Sterilisation nochmals geprüft) in Stufen von 0,5 pH zwischen 4,0—9,0 bei 30° C u. 1 Woche Kulturdauer auf ihr Wachstum untersucht (Tab. 3).

Die Wachstumsspanne ist bei einzelnen Formen weit, wie beim Rispen-gras- und Kleestamm (pH 4—8,5), bei anderen enger, wie beim Roggen-, Petersilien-, Salat- und Maisstamm. Als relativ säuretolerant (mäßiges Wachstum schon bei pH = 4) erweisen sich der Klee- und Rispen-gras-stamm; sie vertragen dafür im Gegensatz zu den anderen Stämmen pH = 9 überhaupt nicht mehr. Im Grenzbereich des Wachstums zeigen sich also Unterschiede zwischen unseren Stämmen, während das Optimum in Übereinstimmung mit den bekannten Arbeiten bei fast allen Formen zwischen pH 6,5—7,5 liegt.

Tabelle 3. Wachstum der *Azotobacter*-Stämme bei verschiedenen pH-Werten.

Az.-Stamm	pH-Wert										
	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
Klee . . .	—	—	—	+	+	++	++	++	+	—	—
Rispengras	—	—	—	+	+	++	++	++	+	—	—
Roggen . .	—	—	—	—	+	+	++	++	+	—	—
Rübe . . .	—	—	—	—	—	—	++	++	++	+	—
Taubnessel	—	—	—	—	—	+	++	++	++	+	—
Zwiebel . .	—	—	—	—	+	+	++	++	+	—	—
Mais . . .	—	—	—	—	—	—	++	++	+	+	—
Salat . . .	—	—	—	—	—	+	++	++	+	+	—
Petersilie . .	—	—	—	—	+	+	++	++	+	+	—
Erbse . . .	—	—	—	—	—	+	++	++	++	+	—
Sonnenbl.	—	—	—	—	+	+	++	++	++	+	—

+++ optimales, + gutes, - mäßiges, -- schlechtes, ---- kein Wachstum.

6. Die Stickstoffbindung der einzelnen Stämme.

Bisher wurde *A.* hauptsächlich wegen seiner Fähigkeit zur Stickstoffbindung beachtet und dementsprechend diese Stoffwechsel-eigentümlichkeit besonders eingehend und vielfach untersucht. Daraus entwickelte sich geradezu der Begriff des „guten“ und „schlechten“ N-Binders. Nach verschiedenen Angaben (GERLACH u. VOGEL, KRAINSKY, KOSTYTSCHEW, RYSTALTSCHUK, SCHWEZOWA, KRZEMIENIEWSKI u. a.) liegt die mittlere je 1 g Zucker gebundene N-Menge zwischen etwa 10—30 mg

und erweist sich von dem gebotenen Kohlenhydrat, der Rasse und der physiologischen Vorgeschichte der Bakterien abhängig.

Nach FISCHER unterscheidet sich die N-Bindung der einzelnen Formen nur anfangs und strebt nach 1—2 wöchiger Kulturdauer einem \pm gleichartigen Endwert zu. Deshalb untersuchten wir unsere Stämme nach dem Halbmikro-KJELDAHL-Verfahren (Apparat PARNAS-WAGNER) auf N-Gewinn nach 1, 2, 4 und 10 Tagen Kulturdauer bei 30° C. Aus der Nährösungsschüttelkultur wurden in den genannten Zeitabständen jeweils 50 cm³ steril abpipettiert und 5 Parallelen zu je 8 cm³ analysiert; die Ergebnisse nach Abzug des Blindwertes zeigt Abb. 1.

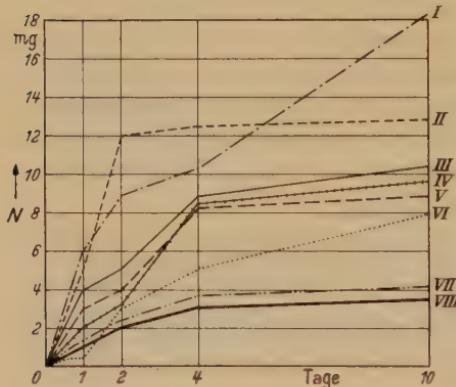


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der N-Bindung verschiedener *Azotobacter*-Stämme.

I von Klee, II von Rispengras, III von Taubnessel, IV von Roggen, V von Rüben, VI von Petersilie, VII von Erbse, VIII von Sonnenblume.

Bindung bei den einzelnen Formen festgestellt werden, sondern auch die Endwerte erwiesen sich (im Gegensatz zu FISCHERS Angaben) stark unterschiedlich. Der Kleestamm eilt am 1. Tag den anderen voraus (6,37 mg N), wird kurz vom Rispengrasstamm überholt, erreicht nach Verlauf einer Woche wieder die Spitze mit 18,05 mg N am 10. Tage. Der

Es konnte nicht nur eine sehr verschiedene Anfangsgröße der N-

Rispengrasstamm schränkt nach dem 2. Tag seine N-Bindung wesentlich ein und erreicht als zweitbester N-Binder nach 10 Tagen 13,41 mg; die anderen Stämme bleiben dagegen stärker zurück (ihre Endbindung liegt um 10 mg). Schlechte Stickstoffbinder sind der Sonnenblumen- und Erbsenstamm mit 3,49 und 4,01 mg Endbindung. Hier offenbart sich eine ziemliche *Gleichläufigkeit* in der Reihung der Stämme nach Atmungs- und Stickstoffbindungsgröße, was u. a. auf abgestufte Fähigkeit zur Eiweißsynthese unserer Stämme hinweist.

7. Der zeitliche Verlauf der KH-Ausnützung für die N-Bindung.

Nach FISCHER verbraucht *A.* zunächst KH, ohne nennenswert elementaren N zu assimilieren, dann nach einer „Induktionsperiode“ mit verhältnismäßig geringer N-Bindung wird schließlich, in der „Periode des großen Wachstums“ von allen Stämmen eine relativ ökonomische N-Bindung gleichen Ausmaßes erreicht.

In unseren 10-tägigen Versuchen wurden 8 in ihrem physiologischen Verhalten unterschiedliche Stämme fortlaufend auf C-Verbrauch und N-Gewinn untersucht. Von jedem Stamm wurden 5 ERLENMEYER-Kolben mit je 50 cm³ Nährösung beimpft und in Schüttelkultur bei 35° C gehalten, nach 1, 2, 4 und 10 Tagen Proben zur N-Bestimmung nach KJELDAHL und zur C-Bestimmung nach ALTEN entnommen. Während die KJELDAHL-Analyse an je 10 cm³ Bakteriengesamtsuspension vorgenommen wurde, erfolgte die Kohlenstoffbestimmung an jeweils 10 cm³ bakterienfreiem Filtrat der Nährösung. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 zusammengefaßt, derart, daß als Ordinate das Verhältnis: $\frac{\text{verbrauchte mg C}}{\text{verbundene mg N}}$ dargestellt ist.

Entsprechend FISCHERS Befunden ist die anfängliche Ökonomie der N-Bindung ziemlich schlecht, wird zwischen 2. und 4. Tag wesentlich günstiger und strebt von da ab einem ± gleichbleibenden Endwert zu. Dieser liegt aber im Gegensatz zu FISCHERS Ergebnissen bei unseren

Stämmen sehr verschieden hoch, so daß wir auch in der C-Ausnützung unserer Formen dauernde deutliche Unterschiede feststellen können. Die ökonomischen N-Binder sind der Klee- und Rispengrasstamm; dann folgen Taubnessel-, Roggen-, Rüben-, Zwiebelstamm; den höchsten C-Verbrauch in bezug auf die N-Assimilation weisen schließlich Erbsen-

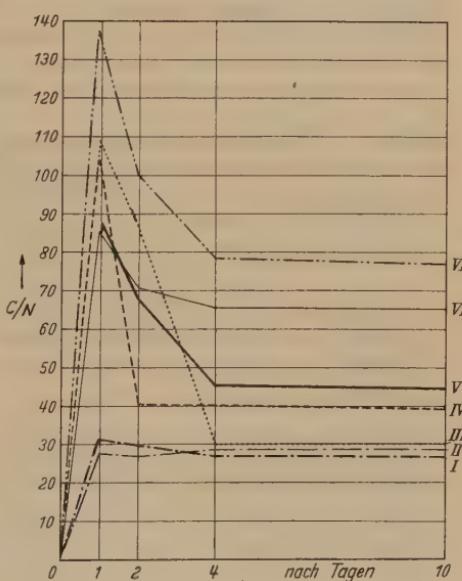


Abb. 2. C/N-Bilanz der einzelnen *Azotobacter*-Stämme: I von Klee, II von Rispengras, III von Taubnessel, IV von Roggen, V von Rüben, VI von Zwiebel, VII von Erbsen.

und Sonnenblumenstamm auf. Das Verhältnis der C-Ökonomie zwischen dem besten und schlechtesten Stamm unserer Versuche beträgt etwa 3:1. Dieser Befund kann von großer praktischer Bedeutung werden, da geeignete Stämme danach bei relativ geringer C-Versorgung noch wesentlich mehr N zu fixieren vermögen als andere. In dieser Hinsicht war nun besonders interessant, das N-Bindungsvermögen unserer Stämme bei Verdünnung der C-Quelle zu prüfen:

8. Versuche mit herabgesetzter C-Versorgung.

POSCHENRIEDER (a) und andere Forscher, wie HILTNER, glauben, daß die von den Wurzeln ausgeschiedenen Mengen organischer Stoffe zur Ernährung von *Azotobacter* im Boden genügen; andererseits bezweifeln JENSEN und STARC die Befunde von TRUFFAUT und BEZSONOFF, wonach die abgeschiedenen C-Mengen genügten, um *A.* zu einer N-Bindung anzuregen, die ihrerseits für den Bedarf der höheren Pflanzen ausreicht. FISCHER fand in KH-Verdünnungsversuchen, daß geringe Glucosekonzentrationen bezüglich der N-Bindung nicht ökonomischer verwendet werden als die Normalgabe; andererseits soll nach WAKSMAN die relative N-Assimilation mit sinkender KH-Gabe ansteigen.

Wir verdünnten unsere Ausgangslösung mit 1% Zuckergehalt stufenweise auf 0,5, 0,25, 0,125 und 0,063% und zogen in 20 cm³ derartiger Nährlösungen unsere Stämme 10 Tage in Schüttelkultur. Die Ergebnisse finden sich in Tab. 4.

Tabelle 4. N-Bindung einzelner *Azotobacter*-Stämme bei abnehmenden Glucosegaben.

Konzentration der C-Gabe	N-Bindungswerte berechnet auf gleiche C-Gabe						
	Rispengras	Klee	Roggen	Taubnessel	Sonnenblume	Zwiebel	Erbse
1%	12,05	11,20	9,60	8,37	3,87	6,58	5,63
0,5%	13,1	19,53	9,54	8,49	4,16	5,46	5,37
0,25%	17,00	19,61	7,72	7,63	1,92	2,52	3,82
0,124%	17,00	5,20	5,43	6,29	1,84	1,92	1,41
0,063%	1,36	1,94	—	2,03	—	—	0,43

Als wesentlichstes Ergebnis läßt sich aus dieser Zusammenstellung entnehmen, daß der Klee- und Rispengrasstamm, die uns aus dem vorhergehenden Abschnitt als ökonomischste N-Binder bekannt sind, mit sinkender KH-Konzentration bis 0,25% ihre ökonomische Leistung sogar erhöhen. Die übrigen Stämme zeigen, wie zu erwarten war, einen zunehmenden stärkeren Abfall der N-Fixation mit sinkender Zuckergabe. Sofern es auf möglichst hohe N-Bindung bei geringem KH-Angebot bei *A.* ankommt, wären also die Stämme sehr ungleichwertig. Es besteht aber schon längere Zeit die Vermutung, daß die zusätzliche N-Versorgung der höheren Pflanze nicht das allein wesentliche der *A.*-Wirkung darstellt; es sind noch andere Wechselbeziehungen zwischen *A.* und dem Wurzelsystem der höheren Pflanzen möglich.

Die Bilanzversuche wurden zunächst ohne Molybdänzusatz ausgeführt; da jedoch dieses für die N-Bindung notwendige Element auch den C/N-

Quotienten beeinflussen dürfte, werden die Versuche fortgesetzt und es wird später darüber berichtet werden.

9. Wirkung von A.-Stoffwechselprodukten auf isolierte Wurzeln.

Die Arbeiten von ROBBING, KOTTE, WHITE und anderen Forschern geben uns Mittel in die Hand, abgetrennte Wurzelstücke auf synthetischem Nährboden weiterzuzüchten. Für die Bearbeitung vieler pflanzenphysiologischer Probleme scheint nun die Organkultur die geeignetste Methode (vgl. KANDLER) und auch für unser Vorhaben besonders brauchbar.

Nicht zuletzt war an den Einfluß von Wirkstoffen zu denken, da auxinartige Stoffe als Abscheidungen von Bakterien schon länger bekannt sind (vgl. JANKE, 1939); neuerdings wurde die Wuchsstoffproduktion von *A.* durch KRONBERGER (b) hervorgehoben. KRASILNIKOF prüfte 1939 als erster *A.*-Abscheidungen an isoliert wachsenden Erbsen- und Weizenwurzeln: Filtrate von *A. chroococcum* hemmten, solche von *A. vinelandii* förderten das Wurzelwachstum; KANDLER fand dann an *Subtilis*- und *A.*-Kulturfiltraten eine von der Konzentration abhängige Wirkung und stellte im Gegensatz zu KRASILNIKOF Hitzeaktivierung der Wirkstoffe fest.

Wir zogen unsere Wurzelkulturen auf USPENSKI-WHITE-Nähragar mit 2% Glucose in Schrägröhrchen heran. Die dazu nötigen sterilen Wurzelspitzen wurden von bromwassersterilisierten Samen gewonnen, die auf sterilem Agar 2—3 Tage bei 30° angekeimt waren.

Von 30tägigen, täglich geschüttelten *A.*-Kulturen wurde durch Membranfilter Nr. 5 ein keimfreies Filtrat gewonnen und dieses zu $1/_{10}$, $1/_{100}$, $1/_{200}$ und $1/_{500}$ des Volumens dem noch flüssigen WHITE-Agar zugemischt. Als Kontrolle diente ein Zusatz von 0,5 cm³ unbeimpfter *A.*-Nährlösung. Alle Versuche wurden mit 10 Parallelen ausgeführt, die 0,8 mm langen Wurzelspitzen in den schräg erstarrten Agar leicht eingedrückt und bei 27—30° C dunkel kultiviert. Da die Kultur von Sonnenblumenwurzeln trotz verschiedener Zusätze (Hefeextrakt und dgl.) mißlang, kamen vorwiegend Mais-, Erbsen- und Roggenwurzeln zum Versuch.

Besonders interessant nach unseren bisherigen Erfahrungen waren natürlich die Absonderungen des Klee- und Rispengrasstamms. Gegenüber den Zuwachsgrößen der Kontrolle ergaben die Kulturfiltrate durchwegs Hemmungen, die mit sinkender Konzentration abnahmen. Die Verdünnung 1 : 10 ergab an Erbsenwurzeln bei beiden Stämmen sehr starke Hemmung, starke Verdickung der Wurzelspitzen — was an Heterauxinwirkung erinnert — und tötete die Wurzeln nach einigen Tagen. Die Konzentration 1 : 100 ergab keine abnormalen Verdickungen mehr, aber noch starke Beeinträchtigung des Wachstums, wie aus Tab. 5 hervorgeht.

Tabelle 5. Einfluß der Filtrate des Klee- und Rispengrasstamms auf Erbsenwurzeln.

Konzentration	Kleestamm			Rispengrasstamm		
	Anfangslänge mm	Endlänge mm	Zuwachs mm	Anfangslänge mm	Endlänge mm	Zuwachs mm
1 : 10	0,8	12,9	12,1	0,8	12,7	11,9
1 : 100	0,8	28,2	27,4	0,8	24,3	23,5
1 : 200	0,8	33,4	32,6	0,8	37,2	36,4
1 : 500	0,8	50,6	49,8	0,8	58,1	57,3
Kontrolle	0,8	70,5	69,7	0,8	71,5	70,7

Das Auftreten abnormer Wuchsformen und die mit Verdünnung sinkende Hemmwirkung legte eine heteroauxinartige Wirkung nahe; zur weiteren Klärung des Problems wurde von uns eine relativ hohe Konzentration des Kleestammfiltrates (1 : 5) 30 min im Autoklaven auf 120°C erhitzt. Danach blieb die Verdickung der Erbsenwurzelspitze zwar aus, die Hemmung bestand aber weiter. Demnach werden neben einem heteroauxinartigen Stoff auch noch andere Substanzen wirksam sein.

Da Indolylessigsäure (I.E.S.) durch oxyd. Desaminierung aus Tryptophan gebildet wird, das in Pepton reichlich vorhanden ist, ergab geringer Peptonzusatz (0,3%) zur A.-Kulturlösung die Möglichkeit, die Anwesenheit von I.E.S. unter den A.-Abscheidungen weiterhin zu prüfen. Tatsächlich trat nun auch unter sonst gleichen Verhältnissen noch in Verdünnung 1 : 100 Wurzelverdickung auf, verbunden mit stärkerer Hemmung des Wurzelwachstums gegenüber dem peptonfreien Filtrat (Tab. 6).

Tabelle 6. *Filtratwirkung des Kleestamms, mit und ohne Pepton kultiviert, auf Erbsenwurzeln.*

Konzentration des Filtrats	Wirkung des Kleestamms	
	ohne Pepton kultiviert	mit Pepton kultiviert
	Längenwachstum der Wurzeln in mm	
1 : 10	12,9 (Verdickg. d. W.)	11,7 (Verdickg. d. W.)
1 : 100	28,2	15,6 (Verdickg. d. W.)
1 : 200	33,4	29,7
1 : 500	50,6	38,2
Kontrolle	70,5	

Maiswurzeln waren gegenüber den gleichen Verhältnissen der Kulturfiltate weniger empfindlich als Erbsenwurzeln, wenngleich auch hier noch alle Konzentrationen Hemmung erkennen ließen, bei 1 : 10 gab es auch abnorme Verdickung der Spitze, aber kein Absterben mehr (Tab. 7).

Tabelle 7. *Filtratwirkung des Klee- und Rispengrasstamms auf Maiswurzeln.*

Konzentration	Kleestamm			Rispengrasstamm		
	Anfangs- länge mm	Endlänge mm	Zuwachs mm	Anfangs- länge mm	Endlänge mm	Zuwachs mm
1 : 10	0,8	21,4	20,6	0,8	36,2	25,4
1 : 100	0,8	36,6	35,8	0,8	52,9	52,1
1 : 200	0,8	59,7	58,9	0,8	56,4	55,6
1 : 500	0,8	71,9	71,1	0,8	74,6	73,8
Kontrolle	0,8	81,3	80,5	0,8	97,7	96,9

Roggenwurzeln zeigten ceteris paribus nicht nur keine Verdickung bei 1 : 10 (wohl noch Hemmung), sondern ab 1 : 100 bereits eine zunehmende Wuchsförderung durch die Bakterienabscheidungen. Die daraus abzuleitende Annahme, daß die Hemmungen der I.E.S. für die 3 ge-

nannten Wurzelarten verschieden hoch liegt, werden wir experimentell weiter verfolgen, ebenso die Wirkung der *A.*-Filtrate im Hafer-Zylinder-test im Vergleich mit abgestuften I.E.S.-Konzentrationen.

Anschließend wurde auch noch die Wirkung der Filtrate der anderen Stämme unter gleichen Bedingungen auf unsere Wurzelkulturen geprüft; es würde zu weit führen, alle Ergebnisse auch nur tabellarisch zu bringen, deshalb seien nur die wichtigsten Befunde hervorgehoben:

An Erbsenwurzeln bewirkten die Verdünnungen 1 : 10 der Filtrate von Taubnessel- und Erbsenstamm die geschilderten Verdickungen, allerdings schwächer ausgeprägt. Die Hemmwirkung von Filtraten nach Peptongabe war wieder verstärkt; allerdings ließ sich durch $\frac{1}{2}$ stündiges Autoklavieren bzw. mehrtägige Sonnenbestrahlung der Filtrate die Wuchshemmung nicht so wesentlich herabdrücken, wie für reine I.E.S.-Wirkung zu erwarten gewesen wäre.

Die weniger aktiven *A.*-Stämme ergaben in vielen Fällen erwartungsgemäß Förderungen des Wurzelwachstums, oft schon ab Konz. 1 : 200, bzw. bei 1 : 500. Nur bei Roggenwurzeln war das Ergebnis uneinheitlich; sonst läßt sich sagen, daß die nach bisherigen Befunden weniger aktiven Stämme auch weniger Wirkstoffe bilden, wobei die Hemmwirkungen eher in eine Förderung des Wurzelzuwachses übergeht. Eine Übertragung dieser Befunde auf die natürlichen Verhältnisse im Boden bedarf aber einiger Einschränkung:

1. In künstlicher Kultur findet *A.* wahrscheinlich viel bessere Entwicklungsbedingungen als im Konkurrenzkampf mit den anderen Rhizosphärenorganismen im Boden. — 2. Die Gegenwirkung der verschiedenen Wurzeln mit ihren Ausscheidungen auf *A.* blieb im vorstehenden unberücksichtigt (sie wird erst in den folgenden Abschnitten behandelt). — 3. Die Adsorptionserscheinungen der Bodenkoide für größer-molekulare Wirkstoffe fielen in unseren Versuchen weg. — 4. Da die Wirkstoffe nach Aufnahme durch die Wurzel mit dem Transpirationsstrom auch in den Sproß gelangen, gibt der Einfluß auf die unterirdischen Teile allein kein vollständiges Bild der *A.*-Wirkung auf die höhere Pflanze.

*10. Einfluß der *A.*-Stämme auf das Streckungswachstum des Sprosses (der Koleoptile).*

Zur Klärung des letztgenannten Punktes wurden in Anlehnung an KRONBERGERS (b) Methode, die durch ihre Einfachheit besticht, steril herangezogene Roggenkeime mit 2—3 mm Koleoptillänge auf *A.*-Kultur in Agarschrägröhrchen gesetzt und ihr Wachstum mit gleichartigen Keimlingen auf steriles Mannitagar (Kontrollen) nach 3 Tagen verglichen. Alle Ansätze erfolgten mit 15 Parallelens; aus den Einzelmessungen der Koleoptillänge wurde der mittlere Fehler (mF) nach der GAUSSSchen Formel berechnet.

Die Ergebnisse (vgl. Tab. 8) liegen weit außerhalb des statistischen Streubereiches; allgemein sind Förderungen des Koleoptilzuwachses zu verzeichnen, allerdings in recht verschiedenem Ausmaße: an der Spitze stehen wieder der Klee- und Rispengrasstamm, deren Hemmung gegenüber der Wurzel besonders deutlich war. Das steht in Einklang mit der

Tabelle 8. Einfluß der *Azotobacter*-Stämme auf das Längenwachstum der Koleoptile.

Stamm	Zuwachs der Koleoptile innerhalb von 3 Tagen			
	Endlänge in mm	mF	Zuwachs gegenüber der Kontr. in mm	Fördg. in %
Klee	29,2	± 1,2	15,7	116,29
Rispengras	28,7	± 2,6	15,2	112,58
Roggen	22,7	± 2,3	9,2	68,14
Rübe	19,6	± 2,7	6,1	45,18
Taubnessel	19,6	± 2,1	6,1	45,18
Zwiebel	20,3	± 3,4	6,8	50,37
Mais	15,5	± 2,8	2,0	14,81
Salat	17,6	± 1,4	4,2	31,11
Petersilie	23,4	± 2,1	9,9	73,33
Erbse	24,2	± 1,9	10,7	79,25
Sonnenblume . . .	16,2	± 1,4	2,7	20,0
Kontrolle	13,5	± 1,7		

allgemeinen Annahme, daß gleiche Konzentrationen von Auxin auf die Wurzel hemmend, auf den Sproß aber schon stark fördernd wirken können. Dieses Ergebnis läßt uns auch die *A.*-Frage in einem für die Praxis neuen Licht sehen; in Übereinstimmung mit JENSEN, KRASILNIKOFF u. a. ist anzunehmen, daß *A.* im Boden nicht so sehr wegen seiner N-Bindung, sondern auf Grund seiner Wirkstoffbildung für die höhere Pflanze wichtig ist [vgl. dazu auch NAUNDORF und NILSSON, KRONBERGER (b)].

II. Wirkung der Wurzelausscheidungen auf das *A.*-Wachstum.

Im Vorhergehenden wurde betont, daß auch eine Wirkung der Wurzel auf *A.* zu beobachten sei; dieser Frage ist der folgende Abschnitt gewidmet. Wir erwähnten eingangs einerseits die Anreicherung von *A.* in der inneren Rhizosphäre, andererseits das fast völlige Fehlen dieses N-Binders in der Nähe bestimmter Wurzeln, so z. B. beim Schöllkraut. Derartige Wechselbeziehungen im Boden waren Gegenstand jahrzehntelanger Untersuchungen ohne einheitliches Resultat: SAWOSTIN, UPPAL, DALJI und PATEL sprechen von gegenseitiger Förderung, doch wurden aus letzter Zeit auch Impfversuche mit negativem Ergebnis bekannt [vgl. die eingehende Darstellung des Rhizosphärenproblems durch POSCHENRIEDER (c)].

In unseren Versuchen wurden die Kulturlösungen von isoliert gezüchteten Wurzeln von Erbse, Mais, Roggen, Sonnenblume und Tomate nach der BEIJERINCKSchen Auxanogramm-Methode gegen *A.* getestet (je 3 Parallelen). Die Wurzelkultur erfolgte wie oben beschrieben, aber in flüssigem Medium nach WHITE 30 Tage bei 30° C im Dunkeln, während dieser Zeit verlängerten die ursprünglich etwa 10 mm langen Wurzelstücke sich auf das 3—4fache. Je 1 cm³ dieser Nährlösungen wurde sodann in Rinnen eingebracht, die mit steriles Skalpell in Mannitagarplatten geschnitten wurden, nachdem der Bakteriennährboden mit möglichst gleichmäßigen Impfstrichen der einzelnen Stämme versehen worden war.

Abb. 3 läßt die Versuchsanordnung und einige kennzeichnende Resultate erkennen, in der Rinne befindet sich Erbsenwurzelkulturlösung.

Um die Wirkung der Wurzelabscheidung näher zu analysieren, wurde ein Teil der WHITE-Lösung nach Wurzelkultur 10 min auf 120° erhitzt bzw. mit Aktivkohle ausgeschüttelt. Die Kontrollen erhielten in der Rinne 1 cm³ frische WHITE-Lösung.

Nach 10 Tagen wurden die Versuche ausgewertet, dabei wurde Wuchsförderung dann angenommen, wenn der Impfstrich sich in der Nähe der Rinne verbreiterte, Hemmung, wenn der Bakterienbelag in der Diffusionszone herabgemindert war oder Wachstum ganz ausblieb (vgl. Tab. 9).

Wie aus Abb. 3 und Tab. 9 hervorgeht, unterscheiden sich die Stämme wesentlich: Vielfach traten Hemmungen des Bakterienwachstums auf, besonders beim Zwiebel- und Rübenstamm; auch Erbsen-, Mais-, Petersilien- und auffallenderweise auch der sonst so „virulente“ Rispengrasstamm erwiesen sich gegen Wurzelabscheidungen recht empfindlich. Klee-, Roggen- und Sonnenblumenstamm erfuhrn dagegen vielfach deutliche Förderungen, der Salatstamm verhielt sich meist indifferent.



Abb. 3. Einfluß der Wurzelexkrete auf das Wachstum der *Azotobacter*-Stämme. Bezeichnung der Stämme: 1. von Zwiebel, 2. von Taubnessel, 3. von Mais, 4. von Rübe, 5. von Petersilie, 6. von Sonnenblume, 7. von Roggen. Weitere Erklärung im Text.

Tabelle 9. Einfluß verschiedener Wurzelexkrete auf das Wachstum der A.-Stämme.

↓ Förderung: — Indifferenz: — Hemmung

sonstigen Verhalten so auffallend empfindliche Rispengrasstamm gerade durch die Wurzelabscheidungen einer Graminee (also einer seiner Herkunftspflanze familiengleichen Gattung, nämlich Roggen), gefördert wurde.

Eine Wiederholung der Versuchsreihe ergab gleichsinnige Resultate; ein direkter Ernährungseinfluß der Wurzelextrakte war bei Förderungen ziemlich sicher auszuschließen, da das *A.*-Substrat an sich dem Bakterium optimale Wachstumsbedingungen bietet; auch wurde gerade bei starken Förderungen (Roggen-, Sonnenblumen- und Kleestamm) eine raschere Pigmentbildung als bei normaler Kultur (nach 3 gegenüber 7 Tagen) beobachtet, was auf rascheren Verbrauch der Nährstoffe des Substrates als Folge des beschleunigten Wachstums gedeutet werden kann [RIPPEL (b)]. Es galt nun, nicht nur das Wachstum, sondern auch die N-Bindung unserer Stämme unter dem Einfluß der Wurzelausscheidungen zu prüfen.

12. Das N-Bindungsvermögen der *A.*-Stämme unter der Wirkung von Wurzelexkreten.

Von Nährlösungen nach WHITE, in denen, wie oben geschildert, Tomaten-, Zwiebel-, Erbsen-, Klee- und Bohnenwurzeln 30 Tage kultiviert worden waren, wurden je 0,5 cm³ zu Glucoseagar zugefügt, dieser schräg in Röhrchen erstarren gelassen und mit 1 Öse *A.* beimpft (je 5–6 Parallelen und 4–6 Kontrollen, 20 Tage Kultur bei 30° C). Sicherheitshalber wurden auch die Wurzelausscheidungen nach KJELDAHL untersucht, die Werte als Blindwert von den Ergebnissen abgezogen; diese sind für Klee-, Sonnenblumen- und Rübenstamm in Tab. 10 aufgeführt.

Tabelle 10. Einfluß von Wurzelausscheidungsstoffen auf das N-Bindungsvermögen der *Azotobacter*-Stämme.

Wurzelausscheidung von	n	Kleestamm		Sonnenblumenstamm		Rübenstamm		
		N-Geh. in mg	Förderg. mg	n	N-Geh. in mg	Förderg. mg	n	N-Geh. in mg
Tomate	6	18,32	—	5	4,11	—	5	8,62
Zwiebel	6	22,57	4,14	5	4,53	0,32	5	9,16
Erbse	6	23,21	4,78	5	5,27	1,06	5	8,78
Klee	6	31,33	12,90	5	5,19	0,98	5	9,38
Bohne	6	41,65	23,22	5	7,36	3,15	5	10,2
Kontrolle . . .	6	18,43	—	4	4,21	—	4	9,63

n = Anzahl der jeweiligen Parallelen.

Tomatenwurzelexkret förderte die N-Bindung der untersuchten Stämme nicht, dagegen bewirkten die Exkrete der anderen Wurzeln, ganz besonders der Bohnen, beim Klee- und Sonnenblumenstamm deutliche Vermehrung des N-Gewinnes. Die N-Bindung des Rübenstammes aber wurde, wenn auch nicht wesentlich, durch fast alle Wurzelausscheidungen herabgesetzt.

Die Ergebnisse stimmen insofern gut zum vorhergehenden Abschnitt als auch im Auxanogramm für den Klee- und Sonnenblumenstamm eine

Begünstigung, beim Rübenstamm aber eine allgemeine Schädigung durch Wurzelexkrete zu verzeichnen war.

Während die Hemmungen der N-Bindung aber recht geringfügig sind, erreichen die Förderungen (bes. d. Bohnenwurzel) erhebliche Ausmaße, so daß abschließend wohl behauptet werden kann, daß im großen und ganzen die Wurzelabsonderungen die N-Bindungskraft von *A.* in der Rhizosphäre begünstigen können.

Alle bisherigen Versuche zielten auf eine Analyse der gegenseitigen Stoffwechselbeziehungen ab, werden aber gerade deshalb durch Ausschaltung bzw. Vereinfachung des Faktorenkomplexes den natürlichen Verhältnissen wenig gerecht; im folgenden soll daher den Bedingungen in der Natur mehr Rechnung getragen werden. Mit den Impfversuchen betreten wir eines der umstrittensten und aktuellsten Gebiete der *A.*-Forschung.

13. Impfversuche an Sandkulturen mit Azotobacterstämmen.

Im Gegensatz zu den natürlichen Verhältnissen im Freiland wurden unsere Kulturen mit steril herangezogenen Pflanzen auf praktisch keimfreiem Quarzsand mit Knop + AZ-Lösung angesetzt und auf verschiedene Arten mit unseren reinen *A.*-Rassen beimpft. So war zwar die Konkurrenz bzw. Interferenz anderer Bodenbakterien ausgeschaltet, aber *A.* mußte hier mit den organischen Stoffen der Wurzelausscheidungen auskommen, was eine Annäherung an die natürlichen Bedingungen bedeutet.

Zu unseren Versuchen wurden Erbsenpflanzen gewählt, da bei ihnen infolge der normalen Symbiose mit Knöllchenbakterien (die hier ausgeschaltet waren) ein entsprechendes N-Bedürfnis anzunehmen war, das deutliche Ausschläge versprach.

In glasierte Töpfe mit je 1½ kg grobem Quarzsand (Wasserkapazität 3,4%, capillare Steighöhe 20 mm) legten wir je 12 mit Bromwasser sterilisierte Samen: nach Aufgehen der Saat wurden die kräftigsten und schwächsten Pflanzen bis auf 4 entfernt entsprechend auch bei der Kontrolle (jeweils 2 Parallelen).

Die Impfung mit Erbsen-, Mais- und Sonnenblumenstamm geschah auf folgende Weise, deren Auswirkung für die Praxis erprobt werden sollte: Methode I: Die sterilen Samen wurden direkt in eine dicke *A.*-Suspension getaucht und mit den nun daran haftenden Keimen in den Sand gepflanzt. — Methode II: Nach steriler Keimung auf Agarplatten wurden die Keimwurzeln in die Bakterienaufschwemmung getaucht und so ausgepflanzt. — Methode III: Die sterilen Samen kamen sogleich in den Sand, dieser wurde sodann jeweils mit 15 cm³ *A.*-Suspension begossen.

Der Versuch begann am 21. 9. 1949 in einem Südgewächshaus der Botanischen Staatsanstalten und wurde am 9. 12. abgebrochen; infolge der späten Jahreszeit gelangten die Pflanzen nicht zur Vollreife; immerhin waren bei Versuchsende schon deutliche Unterschiede feststellbar. Die Pflanzen wurden sandfrei gewaschen, kleine Wurzelteile auf Glucoseagar zur Prüfung auf lebende *A.*-Zellen ausgelegt, die übrigen Pflanzen zerkleinert, bei 104° C getrocknet und der N-Gehalt nach KJELDAHL ermittelt. In der folgenden Tab. II sind die Mittelwerte aus je 3 Parallelen zusammengestellt; Abb. 4 vermittelt ein Bild der Versuchsanstellung.

Auf Erbsen wirkte besonders Impfung mit Erbsenstamm, weniger mit Taubnessel- über Maisstamm. Fast allgemein ergaben sich Förderungen;

Tabelle 11. Trockengewichte und N-Gehalte beiimpfter Erbsenpflanzen.

Art der Pflanze	beimpft nach Methode	Trockengewicht		N-Gehalt	
		in mg	Fdg. in %	in mg	Fdg. in %
Kontrolle	—	933	—	3,90	—
mit Erbsenstamm . .	I	1176	26,0	5,14	31,6
	II	1070	14,7	4,11	5,4
	III	1138	22,0	4,73	16,2
mit Maisstamm . . .	I	951	1,9	4,11	5,4
	II	946	1,4	3,99	2,3
	III	930	—	3,83	—
mit Taubnesselstamm	I	1032	10,6	4,13	5,9
	II	986	5,7	3,96	1,5
	III	977	4,7	3,89	—

Hemmungen durch *A.*-Impfung traten in unserem Fall praktisch nicht auf. Die ausgesprochen günstige Wirkung gerade des Erbsenstammes, der sonst nicht gerade zu den physiologisch aktivsten Formen gehört, läßt sich als physiologische Anpassung zwischen *A.* und „Wirt“ deuten. Die

oben erwähnten Plattenkulturen mit Wurzelproben erwiesen auch die Fähigkeit von *A.*, mit den Wurzelausscheidungen auszukommen, wenn auch innerhalb der Versuchsdauer keine starke Vermehrung der Bakterien festzustellen war. *A.* blieb dabei auf unmittelbare Wurzelnähe beschränkt, da weiter entfernt liegende Sandkörnchen sich als *A.*-frei erwiesen.

Besonders wesentlich erscheint uns auch die ganz unterschiedliche Wirkung der Impfmethode auf den Pflanzenertrag: Das Benetzen der Samen mit Bakteriensuspensionen erweist sich nach unseren Ergebnissen als wesentlich geeigneter als die anderen beiden ebenfalls in der landwirtschaftlichen Praxis üblichen Verfahren.

Vergleichen wir diese Ergebnisse mit den früher geschilderten Befunden, so können wir verstehen, daß die Wirkung der Mais- und Taubnesselstamm-



Abb. 4. Erbsenkulturen, links mit *Azotobacter*-„Erbsenstamm“ geimpft, rechts ungeimpft.

Impfung auf Erbse weniger ausgeprägt ist, da ja die Wurzelabscheidungen der Erbse auf diese beiden Stämme vermehrungshemmend wirkten, während der Erbsenstamm günstig beeinflußt wurde. Hier

sehen wir nochmals schön die wechselseitige physiologische Abstimmung der Organismen. Vergleichen wir noch die übrigen Befunde dieser 3 Stämme an Hand von Tab. 12, so ergibt sich klar, daß das Ausmaß der N-Bindung der Stämme für den Impferfolg von geringerem Belange ist als ihre Wuchsstoffbildung.

Tabelle 12. Vergleichswerte der Atmungsintensität, der N-Bindungskraft, der Wirkung auf die Koleoptile und auf das Längenwachstum der Wurzeln der einzelnen Stämme.

Az.-Stamm	Atmungs-intens.	N-Bindung	Wirkung auf das Streckungswachstum der Koleoptile	Wirkung d. Stoffwechselprodukt. auf das Wachstum isol. Erbsenwurzeln
Erbsen	214,89	5,04	79,25% Fdg. 1 : 200 6,41% Fdg. 1 : 500 23,67% „	
Mais	372,16	10,37	14,81% „ 1 : 200 4,63% „ 1 : 500 20,83% „	
Taubnessel . .	399,72	9,40	45,18% „	keine Förderung

Die Impfversuche mit unseren Stämmen werden an anderen Kulturpflanzen von uns fortgesetzt.

Zusammenfassung.

1. Aus der inneren Rhizosphäre verschiedener Wild- und Nutzpflanzen wurden 11 *Azotobacter*-Stämme rein gezüchtet und auf einige kennzeichnende Wuchs- und Stoffwechseleigenschaften geprüft, ebenso auf die Wechselbeziehungen zwischen ihnen und den höheren Pflanzen. In allen Fällen konnten deutliche Unterschiede und zum Teil auch Anpassungserscheinungen zwischen *A.* und der höheren Pflanze festgestellt werden, so daß damit die bislang noch strittige Frage des Bestehens spezifisch angepaßter Stämme im bejahenden Sinne entschieden wird.

2. Die Unterschiede umfassen Atmungsintensität und Dehydraseaktivität (die annähernd gleichsinnig verliefen), den Katalasegehalt (der sich unabhängig von beiden erstgenannten verhielt), sowie Pepton- und Salztoleranz und auch die Reaktionsansprüche.

3. Die N-bindende Kraft der Stämme war zeitlich und im Ausmaß sehr verschieden; ebenso der auf gleiche N-Assimilation bezogene KH-Verbrauch („Ökonomie der N-Bindung“). Die diesbezüglich aktivsten Stämme (Klee- und Rispengrasstamm) zeigten selbst bei verminderter KH-Angebot innerhalb gewisser Grenzen optimale N-Bindung.

4. Kulturfiltrate von *A.* bewirkten an isoliert wachsenden Wurzeln teilweise starke Schädigungen und Formänderungen, die auf Heteroauxinwirkung hinweisen. Durch geeignete Versuchsanstellung konnte die Heteroauxinabscheidung durch *A.* weiter erhärtet werden. Stärkere Verdünnungen des Kulturfiltrates, vor allem weniger aktiver Stämme,

bewirkten bei manchen Wurzeln auch Wuchsförderungen. Die Empfindlichkeit der einzelnen Wurzeln gegenüber *A.*-Abscheidungen war unterschiedlich; neben Heterauxin traten dabei noch thermostabile Hemstoffe auf.

5. Das Streckungswachstum der Roggenkoleoptile wurde durch direkte *A.*-Wirkung auf die Wurzeln allgemein gefördert. Stämme, die bei Wurzeln stark hemmen, begünstigten das Wachstum der Koleoptile besonders deutlich, was mit der verschiedenen Empfindlichkeit von Wurzel und Sproß gegenüber gleichen Wuchsstoffmengen gut vereinbar erscheint.

6. Wurzelexkrete wirkten auf unsere *A.*-Rassen teils fördernd, teils hemmend; nur teilweise war dabei eine Anpassung zwischen „Wirt“ und *A.* feststellbar. Das N-Bindungsvermögen von *A.* wurde durch Wurzelabscheidungen vielfach deutlich begünstigt.

7. Impfversuche an Erbsen in Quarzsandkultur ließen die Wichtigkeit der Verwendung angepaßter Bakterienstämme und die entscheidende Bedeutung der richtigen Impfungsart erkennen. An Ertragshöhe und N-Gewinn erwies sich deutlich die Überlegenheit des Samentauchverfahrens über das Behandeln der Keimplingswurzeln oder Bodenimpfung mit *A.*-Aufschwemmungen.

Literatur.

BEIJERINCK, M. W., u. A. v. DELDEN: Zbl. Bakter. II, 9, 3. (1902). — BERGEYS Manual of Determinative Bacteriology. Sixth Edition. (Board: Robert BREED, E. G. S. MURRAY and D. PARKER-HITCHENS). The Williams & Wilkins Company. 1947. — FISCHER, K. W.: Arch. f. Mikrob. 14, 385 (1950). — GAINY, P. L.: Z. angew. Chem. 40, 1060 (1927). — GERLACH u. VOGEL: Zbl. Bakter. II, 8, 674 (1902). — HILTNER, L.: (a) Arb. dtsch. landw. Ges. 98, 59 (1904). — (b) Mitt. dtsch. L. G. 36 (1921). — ISAKOVA, A. A.: Ref. Chem. Zbl. III, 357 (1940). — JANKE, A.: Zbl. Bakter. 100, 409 (1939). — JENSEN: Journ. Sci. 4, 117 (1942). — KANDLER, O.: Naturwissenschaftl. Rundschau H. 1, 28 (1948). — KEUTNER, F.: Zbl. Bakter. II, 13, 555 (1904). — KOSTYTSCHEW, S. P., RYSTALTSCHUK u. SCHWEZOVA: Z. f. physiol. Ch. 154, 1 (1924). — KOTTE, W.: Beitr. alg. Bot. 2, 209 (1922). — KRASSILNIKOF N. A., u. N. R. GARKINA: Mikrobiology 9, 975 (1939). — KRONBERGER, M.: (a) Prakt. Blätter f. Pflanzenb. u. Pflanzenschutz, Jg. 2, 255, 270 (1925). — (b) Landw. Jb. f. Bayern Jg. 26, H. 3/4, 17 (1949). — KRZMIENIEWSKI, S.: Anz. Akad. Wiss. Krakau Math., Naturw. Kl. 9, 929 (1908). — NAUNDORF, G. u. R. NILSON: Naturwiss. 30, 753 (1942). — NICKLAS, H., u. H. POSCHENRIEDER: Zbl. Bakter. II, 71, 251 (1927). — POSCHENRIEDER, H.: (a) Zbl. Bakter. II, 80, 369 (1930). — (b) Zbl. Bakter. II, 79, 222 (1929). — (c) Landw. Jb. f. Bayern H. 9/10, 26, 53 (1949). — RIPPEL, A.: Forschungsdienst 1, 328 (1936). — (b) Grundriß d. Mikrobiologie 1947. Berlin. — ROBBINS, W. J.: Bot. Gaz. 73, 376 (1922). — SAWOSTIN, P. W.: Ref. Zbl. Bakter. II 100, 236 (1938). — SIDORENKO, J.: Mikrobiology 9, 153 (1940). — STAPP, C., u. G. RUSCHMANN: Arb. biol. Reichsanst. Land- u. Forstw. 13, 305 (1924). ; (a) 13, 346 (1924); (b) 13, 397 (1924). — STARC, A.: Arch. f. Mikrob. 13, 164 (1942). — TRUFFAUT, G. et N. BEZSONOFF: Compt. Rend. Soc. Biol. T. 91 (1924). — UPPAL, B. N., DALJI, M. K. PATEL: Proc. Indien Acad. Sci. 25, 173 (1947). — WITHE, P. R.: Plant. Physiology 7, 618 (1932). — WINTER, A. G.: Arch. Mikrobiol. 14, 240 (1949); (b) 15, 42, 72 (1950). — STRUGGER, S.: Z. f. Naturwiss. 73, 97 Jena 1940. —

Aufnahmebedingungen.

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Selbständige kritische Sammelreferate über einzelne Gebiete sind erwünscht.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Vor kurzem erschien:

Grundriß der Mikrobiologie

Von Dr. August Rippel-Baldes, o. Professor an der Universität Göttingen. Zweite Auflage. Mit 153 Abbildungen. VIII, 404 Seiten. 1952. Ganzleinen DM 36.—

Inhaltsübersicht: Allgemeines: Umgrenzung des Gebietes. Geschichtliches. Kultur und Erkennungsverfahren. — **Der Bau der Zelle:** Form und Größe der Zelle. Bau der Zelle. Entwicklung der Zelle. Systematische Übersicht. — **Baustoffwechsel:** Allgemeines. Mineralstoffe. Kohlenstoff. Stickstoffernährung. Organische Wirkstoffe. Allgemeine äußere Bedingungen. Ertragsgesetz. Förderung durch stoffwechselbare Stoffe. Nahrung und Gift. Desinfektion. — **Betriebsstoffwechsel:** Allgemeines. Enzyme. Sauerstoff- und Wasserstoffaktivierung. Aerobe Atmung. Anaerobe Atmung. Abbau der Stickstoffverbindungen. — **Abbau und Synthese.** — **Die Stellung der Mikroorganismen in der Natur:** Zahl und Verbreitung. Verbreitung der Mikroorganismen. — Zusammenleben der Organismen: Kreislauf der Stoffe. Metabiose und Teilkreisläufe. Epiphytismus und Symbiose. Mikroorganismen und Mensch. Der Parasitismus. Rückblick auf Symbiose und Parasitismus. — **Literatur.** — **Sachverzeichnis.**

Grundriß der Botanik

Von Dr. Otto Stocker, Professor der Botanik an der Technischen Hochschule Darmstadt. Mit 303 Abbildungen. VIII, 264 Seiten. 1952. Ganzleinen DM 16.80

Inhaltsübersicht: Einleitung. Historische und erkenntnismäßige Grundlagen: Geschichte. Umgrenzung und Einteilung. — Systematik (Taxonomie): Prinzipien. Die Hauptgruppen des Pflanzenreichs. — Morphologie: Zytologie. Histologie und Organographie. — Physiologie: Zellphysiologische Grundlagen. Stoffwechselphysiologie. Bewegungsphysiologie. Entwicklungsphysiologie. — Ökologie: Anpassungen an besondere Standortsbedingungen. Anpassungen an besondere Lebensweisen. — Geobotanik (Pflanzengeographie): Floristik. Soziologie. — Quantenbiologie (Biophysik). — Sachverzeichnis.

Während für die akademische Ausbildung in Botanik eine gute Auswahl von Lehrbüchern zur Verfügung steht, mangelt es an einem kurzgefaßten „Grundriß“, welcher, über den Zweck eines Repetitoriums hinausgehend, die wesentlichen Tatsachen in ihrem wissenschaftlichen Zusammenhang, wie Kant sagt, „architektonisch“ aufbaut und damit dem Studierenden eine wirksame Hilfe bei der Verarbeitung der Vorlesung und der Vorbereitung zum Examen bietet. Ein solcher Grundriß ist zunächst notwendig für die große Gruppe von Studierenden, welche, wie Mediziner, Pharmazeuten, Chemiker, Land- und Forstwirte und Teile der Lehramtsanwärter, Botanik nur als Nebenfach zu betreiben haben und ihr deshalb nur eine beschränkte Zeit und Aufnahmefähigkeit widmen können. Ihnen kann nicht wohl zugemutet werden, sich selbst aus der Stofffülle eines Lehrbuches das Wesentliche auszusuchen und in einen Zusammenhang zu bringen. Für den Biologen im Hauptfach gilt im Beginn des Studiums dasselbe; auch er sollte zunächst einmal eine klare Wegleitung in das Gebiet erhalten, in welches er in der Folge an Hand der Lehrbücher in eigener Untersuchungsarbeit tiefer eindringen muß.

Übungen

zur Wachstums- und Entwicklungsphysiologie der Pflanze

Von Dr. Ulrich Ruge, o. Professor für Botanik an der Hochschule für Gartenbau und Landeskultur Hannover. (Pflanzenphysiologische Praktika, IV. Band.) Dritte, verbesserte Auflage. Mit 63 Abbildungen. XIII, 166 Seiten. 1951. Ganzleinen DM 19.60

Inhaltsübersicht: Einführung in das Praktikum. — **Keimung:** Keimfähigkeit. Fermentaktivierung während der Keimung. Keimungsbedingungen. — **Längenwachstum und Wirkstoffe der Zellstreckung:** Erscheinungen des Längenwachstums. Bedeutung der Streckungswuchsstoffe für das Längenwachstum. Extraktion und Test der Streckungswuchsstoffe. Wirkungsweise der Streckungswuchsstoffe und Analyse der Zellstreckung. Anwendung synthetischer Wirkstoffe und die Physiologie der Wirkstoffentstehung. — **Physiologie der Bioswuchsstoffe und des Vitamin B₁:** — **Wundhormone, Polyploidie und Organkultur.** — **Regeneration und Transplantation.** — **Polarität.** — **Korrelation.** — **Symbiose und Avitaminose.** — **Morphosen:** Photomorphosen. Hygromorphosen. Chemomorphosen. Thigmo- und andere Morphosen. — **Reproduktive Phase der pflanzlichen Entwicklung.** — **Physiologie der Resistenz und des Ruhezustandes.** — **Anhang mit praktischen Hinweisen.** — Verzeichnis der Versuchspflanzen. — Sachverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG